

FERNANDO DAVID SÁNCHEZ MORA

**SELEÇÃO ASSISTIDA POR MARCADORES MOLECULARES
NA PIRAMIDAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA AO MÍLDIO
(*Plasmopara viticola*) E OÍDIO (*Erysiphe necator*) EM VIDEIRA**

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Recursos Genéticos Vegetais da
Universidade Federal de Santa
Catarina como parte dos requisitos
necessários para a obtenção do título
de Mestre em Ciências, área de
concentração em Recursos Genéticos
Vegetais.

Orientador

Prof. Dr. Rubens Onofre Nodari

Co-orientador

Prof. Dr. Leocir José Welter

Florianópolis

2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Sánchez Mora, Fernando David

SELEÇÃO ASSISTIDA POR MARCADORES MOLECULARES NA
PIRAMIDAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA AO MÍLDIO (Plasmopara
viticola) E OÍDIO (Erysiphe necator) EM VIDEIRA / Fernando
David Sánchez Mora ; orientador, Rubens Onofre Nodari ;
coorientador, Leocir José Welter. - Florianópolis, SC,
2014.

81 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-
Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.

Inclui referências

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. A cultura da
videira. 3. Uso de Microssatélites ou sequencias simples
repetidas (SSR) no melhoramento de plantas . 4. Seleção
assistida por marcadores. 5. Piramidação de genes de
resistência . I. Onofre Nodari, Rubens . II. Welter,
Leocir José . III. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.
IV. Título.

FERNANDO DAVID SÁNCHEZ MORA

**SELEÇÃO ASSISTIDA POR MARCADORES MOLECULARES
NA PIRAMIDAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA AO MÍLDIO
(*Plasmopara viticola*) E OÍDIO (*Erysiphe necator*) EM VIDEIRA**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de
“Mestre em Recursos Genéticos Vegetais” e aprovada em sua forma
final pelo Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos
Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina.
Florianópolis, 27 de fevereiro de 2014.

Prof. Dr. Rubens Onofre Nodari
Coordenador do PPRGV

Banca examinadora:

Prof. Dr. Rubens Onofre Nodari
Orientador

Dr. Marco Antonio Dalbó
Externo/EPAGRI/SC

Dr. Haroldo Tavares Elias
Externo/EPAGRI/SC

Prof. Dr. Mauricio Sedrez dos Reis
Universidade Federal de Santa Catarina

Aos meus avós

Raúl Octavio Mora Suarez (in memorian)

Luz Elvira Yela Ruiz

A minha mãe

Nidia Rocio Mora Yela

A minha irmã

Zoila Soraida Sánchez Mora

DEDICO

A minha esposa

Liliana Mercedes Garcia Ruiz

A meus filhos

Raúl Fernando Sánchez Garcia

Larissa Suzeli Sánchez Garcia

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradecer ao Nosso Pai Celestial pela vida que nos concede a cada um de nós. Pela oportunidade que me deu de ter novas amizades e pela ajuda que nos brinda para cumprir nossas metas dignas.

Agradeço infinitamente a minha família Liliana, Larissa e Raúl por todo o amor, apoio, sacrifício e compreensão em todas minhas atividades acadêmicas do mestrado. Também aproveito para agradecer a minha família MORA YELA, porque são causa do que eu sou agora. Agradecer à família GARCIA RUIZ por todo o apoio nesta etapa da minha vida.

Meu imenso agradecimento à SENESCYT (Secretaria Nacional de Educación Superior Ciencia y Tecnología – Equador) e à CAPES pelo apoio financeiro na minha preparação profissional e tornar este trabalho possível.

Agradeço ao meu orientador Rubens Onofre Nodari pela oportunidade brindada, sem dúvida esta experiência mudou minha vida profissional. Professor tu és digno deste título pela tua qualidade como pessoa e pesquisador, sou muito grato pela ajuda que me ofereceste durante meu tempo como teu orientado, além do apoio nos tempos mais difíceis para mim na minha estada no Brasil.

Agradeço ao Prof. Leocir José Welter e Família, pela confiança que me brindou ao permitir-me trabalhar no seu projeto de melhoramento da videira. Graças pelo apoio e por todas as indicações e correções que me deu neste trabalho.

Bernadete Ribas, graças por responder meus e-mails de maneira oportuna e eficiente, é admirável seu trabalho na logística do programa.

Luciano Saifert meu amigo, sento muito respeito por você e sou infinitamente grato pela tua amizade e ensinamentos durante minha estadia no laboratório. Graças pela ajuda e se lembre sempre que este trabalho foi em conjunto e você foi ator principal nele.

Aproveito para agradecer a Denise Olkoski, Gustavo Klabunde, Daniel Holderbaum e Ramon Scherer por responder cada uma de minhas perguntas (foram muitas) sobre a área molecular e temas afins. Muito obrigado pela amizade e apoio, guardo grandes lembranças de vocês Profs.

Agradeço também aos Doutores Haroldo Elias, Marco Dalbó e Mauricio dos Reis por aceitarem ler meu trabalho e por todas suas excelentes contribuições.

Agradeço a cada um dos integrantes do programa de melhoramento de videira do campos Curitibanos/UFSC (Jean Zanghelini; Taybar Assumpção; Antônio Coelho; Anderson Varela; Bruno Boesing; Cláudia Piva; Eduardo Novak; Jessica Menon; Renan Giacometti, Gabriel Olivo, Prof. Lirio Dal Vesco entre outros amigos. Amigos do RGV (Suzeli Simon, Gabriella Vanderlinde, Adriano Souza, Virgilio Uarrota, Samuel Kamphorst, Lido Borsuk, Juan Otalora, Diana Diaz, Liliana Pila, Felipe Garces, Jaqueline Muniz, Morgana Lopes, Daniela de Conti, Jenny Corredor, Daniela Ribeiro, Lilian Machado, Rafaela Liz, Sarah Agapito, Leon Bizzocchi, Pâmela Vieira, Roberta Duarte, Vivian Almeida, Tomás Pellizzaro, Joseph Ree, Mathias Ferrari, Alceu Kunze, Glauco Schussler e todos os amigos do LFDGV. Amigos SUD (Sandro Machado, Francisco Santiago, Daniel da Condeição, Lucas da Rosa, Adnir Ramos, Moroni Noronha, Rodrigo Alves, Fabricio Pinheiro, Vanderline Violin e todos meus amigos da ala Agronômica). Amizades que me fortaleceram e formaram academicamente e como pessoa.

Acreditai em Deus; acreditai que ele existe e que criou todas as coisas, tanto no céu como na Terra; acreditai que ele tem toda a sabedoria e todo poder, tanto no céu como na Terra; acreditai que o homem não compreende todas as coisas que o Senhor pode compreender.

Mosias 4: 9 (O Livro de Mórmon, pp.175).

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xii
RESUMO	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. Objetivo geral	3
2.2. Objetivos específicos.....	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1. A cultura da videira	4
3.2. Importância econômica da cultura.....	5
3.3. Principais doenças da videira	6
3.3.1. Oídio.....	6
3.3.2. Míldio.....	8
3.4. Fontes de resistência.....	10
3.5. Uso de Microssatélites ou sequências simples repetidas (SSR) no melhoramento de plantas	11
3.6. Mapeamento de QTLs	13
3.7. Seleção assistida por marcadores	16
3.8. Piramidação de genes de resistência.....	17
4. MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1. Material vegetal	21
4.2. Avaliação genética.....	23
4.2.1. Extração e quantificação de DNA.....	23
4.2.2. Amplificação dos marcadores microssatélites via PCR....	23
4.2.3. Genotipagens no Applied Biosystems 3500 XL.....	24
4.3. Avaliação fenotípica.....	24
4.3.1. Avaliação para o míldio.....	24
4.3.2. Avaliação para o oídio.....	25
4.4. Análise estatística	25
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
5.1. Desenvolvimento de PCR multiplex para SAM.....	26
5.2. Seleção assistida por marcadores moleculares para locos de resistência ao míldio (<i>Plasmopara viticola</i>) em videira	29
5.2.1. Avaliação genética.....	29
5.2.2. Avaliação fenotípica.....	35
5.3. Seleção assistida por marcadores moleculares para locos de resistência ao oídio (<i>Erysiphe necator</i>) em videira	42

5.4.	Desenvolvimento de “linhas” de videira homozigotas para locos de resistência ao míldio (<i>Plasmopara viticola</i>) e oídio (<i>Erysiphe necator</i>) piramidados.....	46
6.	CONCLUSÕES.....	51
7.	PERSPECTIVAS FUTURAS	52
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Diagrama de representação da piramidação de genes de resistência. Adaptado de Pauquet *et al.* (2001) e Eibach *et al.* (2007).. 22
- Figura 2.** Resultado da amplificação mediada por seis pares de iniciadores em uma reação de PCR multiplex, resolvida em gel de agarose a 1,5%. Cada banda representa uma reação independente. Na primeira coluna da esquerda o marcador molecular de 100 pb (Ladder). As seguintes colunas representam plantas com produtos da PCR amplificados pelos marcadores microssatélites. 27
- Figura 3.** Eletroferograma de uma reação multiplex de PCR com marcadores microssatélites na genotipagem da planta 213, homozigota para todos os alelos de resistência. A: marcadores com a fluorescência 6-FAM [(Sc34_8 (211pb); GF15-28 (339pb); GF18-06 (384pb)], B: marcadores com a fluorescência VIC [(Sc35_2 (232pb); GF18-08 (392pb)], e C: marcador GF15-30 (446pb) com fluorescência PET. Plataforma de sequencia utilizada Applied Biosystem 3500 XL. 30
- Figura 4.** Distribuição de frequência em percentagem de nove genótipos com locos relacionados com a resistência ao míldio em 622 plantas provenientes das populações experimentais UFSC-2013-1 e UFSC-2013-2. A: plantas totais, B: plantas divididas por população. 32
- Figura 5.** Valores médios do número de esporangióforos por disco foliar com intervalos de confiança a 95% de nove combinações genotípicas dos locos *Rpv1* e *Rpv3*. Nas plantas com o genótipo *rpv1/rpv1*, *rpv3/rpv3* foram contados os números de esporangióforos até 50. Assim, plantas com maior número de esporangióforos foram incluídas nesta mesma classe. 37
- Figura 6.** Distribuição de frequência (%) para classes de infecção de *P. viticola* em uma população de 142 plantas provenientes das populações experimentais UFSC-2013-1 e UFSC-2013-2. (1: Abundante esporulação; 9: Ausência de esporulação). 40
- Figura 7.** Percentagem do grau de resistência, avaliada com base no número de esporangióforos por disco foliar. 41
- Figura 8.** Distribuição de frequência em percentagem de nove genótipos com locos relacionados com a resistência ao oídio em 616 plantas provenientes das populações experimentais UFSC-2013-1 e UFSC-2013-2. A: plantas totais, B: plantas divididas por população. 44
- Figura 9.** Piramidação dos locos de resistência *Rpv1/Run1*, *Ren3* e *Rpv3*, em duas populações experimentais UFSC-2013-1 e UFSC-2013-2. A: plantas totais, B: plantas divididas por população. 50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Proporções obtidas e teste de qui-quadrado para marcadores que ancoram locos de resistência ao míldio em duas populações segregantes de videira obtidas por autofecundação da F_1	33
Tabela 2. Proporções obtidas e teste de qui-quadrado para marcadores que ancoram locos de resistência ao oídio em duas populações segregantes de videira obtidas por autofecundação da F_1	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2000-305-134: Linha de melhoramento germana de uvas tintas.

2000-305-97: Linha de melhoramento germana de uvas brancas.

B.O.D: Câmara de germinação com fotoperíodo

CCA: Centro de Ciências Agrárias.

DNA: Acido desoxirribonucleico.

DIC: Experimento inteiramente casualizado.

IC: Intervalos de confiança.

Ladder: Marcador de peso molecular de 100 pb.

LFDGV: Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal.

mg: Miligrama.

ng/ μ L: Nanograma por microlitro.

pb: Pares de bases.

PCR: Reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction*).

R: Linguagem estadística R.

SAM: Seleção assistida por marcadores moleculares (*Marker-Assisted Selection*).

SSR: Marcadores microssatélites (*simple sequence repeat*).

UFSC: Universidade Federal de Santa Catarina.

UFSC-2013-1: População experimental de uvas tintas.

UFSC-2013-1: População experimental de uvas brancas.

UV: Luz ultravioleta.

χ^2 : Teste de chi quadrado.

RESUMO

As doenças míldio (*Plasmopara viticola*) e oídio (*Erysiphe necator*) são um sério problema para os produtores de *V. vinifera*. Explorar a resistência genética a estas doenças é uns dos maiores objetivos nos programas de melhoramento genético. O presente trabalho teve por objetivo identificar e selecionar via SAM (Seleção assistida por marcadores moleculares) plantas de videira contendo os locos de resistência contra o míldio (*Rpv1* e *Rpv3*) e o oídio (*Run1* e *Ren3*) piramidados e em homozigose, para utilizá-las em novos ciclos de cruzamento. Foram analisadas as populações experimentais de videira UFSC-2013-1 e UFSC-2013-2 provenientes das linhas de melhoramento 2000-305-134 (uvas tintas) e 2000-305-97 (uvas brancas) que apresentam os locos de resistência *Rpv1/Run1*, *Ren3* e *Rpv3* piramidados e em heterozigose. As 637 plantas das duas progênes F₂ foram genotipadas com seis marcadores microssatélites ligados aos locos de resistência. Para a análise de segregação foi utilizado o teste χ^2 . Nas duas populações estudadas observou-se distorção na segregação com os marcadores microssatélites ligados aos locos de resistência *Rpv1/Run1*, localizados no cromossomo 12. Para o míldio, foram encontradas 300 plantas (48,2%) apresentando os dois locos de resistência piramidados sendo que, destas, 10 plantas carregam os locos de resistência em homozigose. Na avaliação fenotípica o menor valor médio de esporangióforos/disco foi observado nas plantas contendo os dois locos de resistência ao míldio em homozigose (4,9). Para o oídio a genotipagem permitiu identificar 311 plantas (50,5%) apresentando os dois locos de resistência piramidados; destas sete plantas exibiram os dois alelos em homozigose. Na avaliação geral foram encontradas 27 combinações genéticas, onde 231 plantas (38,2%) apresentaram os quatro locos de resistência (*Rpv1/Run1*, *Ren3*, *Rpv3*) piramidados. Foi identificada uma planta carregando os alelos de resistência em homozigose em todos os locos e nove plantas que apresentaram os dois locos de resistência para o míldio em homozigose e para o oídio um loco em homozigose e outro em heterozigose. Estas plantas apresentam extrema importância para o melhoramento genético da videira, pois ao ser utilizada em novos cruzamentos com variedades de importância econômica para o Brasil, todas as progênes obtida apresentarão resistência piramidada para as duas doenças.

ABSTRACT

The diseases downy mildew (*Plasmopara viticola*) and powdery mildew (*Erysiphe necator*) are a serious problem for producers of *V. vinifera*. Exploring the genetic resistance to these diseases is a major objective in breeding programs. This study is aimed to identify and select via Marker Assisted Selection (MAS), grape plants containing resistance alleles at distinct the loci against downy mildew (*Rpv1* and *Rpv3*) and powdery mildew (*Run1* and *Ren3*) pyramided and homozygous, to be used in new cycles of crossing. Two experimental populations of grapes were analyzed, UFSC-2013-1 and UFSC-2013-2, both derived from the breeding lines 2000-305-134 (red wine grape) and 2000-305-97 (white grape) that carry resistance loci against both diseases *Rpv1/Run1*, *Ren3* and *Rpv3* pyramided and heterozygous. The 637 plants from two F₂ progenies were genotyped with six microsatellite markers linked to the resistance loci. The segregation analysis by the χ^2 test revealed distorted segregation at microsatellite loci, which are linked to resistance loci *Rpv1/Run1*, located on chromosome 12. For downy mildew, 300 plants were found (48.2%) showing the two resistance loci pyramided and, from these, 10 plants carried homozygous loci for resistant alleles. Results from phenotypic evaluation showed the lower mean sporangioophores per disc in plants containing both resistance loci, to downy mildew, in homozygous conditions (4.9). For powdery mildew the genotyping allowed us to identify 311 plants (50.5%) that presented resistant alleles at the two pyramided loci, from which, seven plants exhibited homozygous alleles at both loci. Overall, there were found all the 27 genotypic combinations (since two loci are linked), being 231 plants (38.2%) showing resistant alleles at the four loci (*Rpv1/Run1*, *Ren3* and *Rpv3*) pyramided. One plant was identified carrying resistant alleles at all loci in homozygous conditions and nine plants with two homozygous loci for downy mildew and for powdery mildew one homozygous loci and other heterozygous. These plants are extremely important for the genetic improvement of the vine, they will be used in new crosses with varieties of economic importance to Brazil, because all obtained progeny will present pyramided resistance to the both diseases.

1. INTRODUÇÃO

A Videira (*Vitis* spp.) é uma planta sarmentosa (trepadeira) pertencente à família das Vitaceae. No mundo a videira pode ser dividida em três centros de diversidade genética: o euro-asiático com a espécie *Vitis vinifera*; o americano com inúmeras espécies, dentre elas *V. labrusca*, *V. bourquina*, *V. rupestres*, *V. riparia* e *M. rotundifolia* e o centro asiático oriental também rico em espécies, incluindo *V. amurensis*. As variedades europeias (*V. vinifera*), ou uvas finas, representam o melhor em qualidade de fruta para a produção de vinhos finos e espumantes, embora sejam muito susceptíveis ao ataque de patógenos. Já os centros americano e asiático oriental são considerados fontes de inúmeros caracteres de interesse, especialmente genes de resistência a inúmeros patógenos.

No Brasil, variedades da espécie americana *V. labrusca* são muito cultivadas por serem mais rústicas e tolerantes ao ataque de doenças fúngicas, e são conhecidas como uvas comuns, de onde se obtêm os vinhos comuns considerados de menor qualidade. Também são cultivadas variedades híbridas, provenientes predominantemente de cruzamentos entre as variedades americanas e europeias, as quais apresentam maior tolerância às doenças que as europeias e melhor qualidade de fruta que as americanas.

A cultura da videira no mundo é ameaçada principalmente por duas moléstias: o míldio (*Plasmopara viticola* Berk & Kurt) Berlese & de Toni e o oídio (*Erysiphe necator* Schw). No Brasil, o míldio é conhecido vulgarmente como peronóspora, mufa ou mofo, e causa sérios problemas nas épocas com precipitações elevadas. O oídio é conhecido como míldio pulverulento e sua incidência está restrita principalmente a climas secos em áreas tropicais ou em ambientes protegidos.

Em condições ideais de temperatura e umidade, como as do sul do país, o ataque do míldio pode reduzir drasticamente a área foliar da cultura, afetando diretamente a produtividade, a qualidade dos frutos e, conseqüentemente, a rentabilidade do produtor.

Na videira, como em toda cultura que esta exposta ao ataque de patógenos que comprometem a produtividade, são necessárias várias aplicações de fungicidas para controlar as doenças e não perder os investimentos. Muitas vezes estas aplicações químicas não são feitas no momento oportuno, nas concentrações ideais, nem com a proteção adequada; pondo em risco a saúde do agricultor, seguido do ambiente, da fruta *in natura* e do vinho que chega ao consumidor final.

O melhoramento genético tem se direcionado na obtenção de variedades resistentes, que, recentemente, com o auxílio de técnicas moleculares, vem se tornando uma alternativa viável e rápida para contribuir com o controle destas doenças.

A seleção assistida por marcadores moleculares é uma ferramenta útil no melhoramento vegetal, a qual se fundamenta na genotipagem de plantas com marcadores que estão associados a características de interesse agrônomo como QTLs. A piramidação de alelos de resistência às doenças é facilitada pelo uso destes marcadores, já que permite selecionar as plantas contendo as características de interesse dos melhoristas nos primeiros estágios de desenvolvimento de uma nova cultivar.

A Universidade Federal de Santa Catarina, através de seu projeto de melhoramento genético da videira, trabalha no desenvolvimento de novas variedades de videira que conciliem atributos de qualidade com resistência às doenças fúngicas mencionadas. Na avaliação das duas populações de videiras do presente trabalho [UFSC-2013-1 (tinta) e UFSC-2013-2 (branca)], objetiva-se principalmente a piramidação dos locos de resistência *Rpv1/Run1*, *Ren3* e *Rpv3*, mediante a seleção assistida por marcadores moleculares. Como as duas populações foram obtidas por polinização aberta entre plantas F₁ oriundas do mesmo cruzamento, visa-se ainda selecionar dentro das populações os indivíduos que contém os genes de resistência piramidados e em homozigose. Estas plantas posteriormente serão utilizadas em cruzamentos com variedades viníferas de alto potencial enológico, adaptadas a diferentes regiões vitivinícolas brasileiras, com a vantagem de que todas as progênes obtidas apresentarão os alelos de resistência, dispensando a SAM e, com isso, aumentando a eficiência do programa de melhoramento.

Espera-se, assim, diminuir o uso de agrotóxicos no cultivo de novas variedades portadoras de genes de resistência às doenças, que, consequentemente, contribui para a melhoria da saúde humana e ao meio ambiente. Além disso, estas variedades poderão diminuir os custos de produção e consequente melhorar a competitividade da cadeia produtiva.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar progênies de videira que segregam para a resistência genética ao míldio (*P. viticola*) e ao oídio (*E. necator*) mediante o uso da seleção assistida por marcadores moleculares (SAM), visando a piramidação de locos de resistência a estas doenças.

2.2. Objetivos específicos

Identificar e selecionar via SAM plantas de duas progênies de videira contendo locos de resistência piramidados e em homozigose (linhas endogâmicas para os locos de resistência), para utilizá-las em novos ciclos de cruzamento;

Avaliar fenotipicamente as plantas contendo os locos de resistência às doenças piramidados, mediante inoculações artificiais, a fim de verificar a resistência conferida pelos mesmos.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. A cultura da videira

A videira, planta sarmentosa pertencente à família das Vitaceae a qual compreende 14 gêneros, entre os que se inclui *Parthenocissus*, ao qual pertencem as vinhas silvestres (*P. tricuspidata* e *P. quinquefolia*), originárias da Ásia e da América do Norte, e o gênero *Vitis*, originário das zonas temperadas do hemisfério norte (América, Europa e Ásia) (REYNIER, 1995). Em contraste com as famílias tais como Solanaceae, Leguminosae, Rosaceae e Gramíneae, *Vitis* é o único gênero de importância agrícola na família Vitaceae (RIAZ *et al.*, 2004; THIS *et al.*, 2006).

O gênero botânico *Vitis* consiste aproximadamente de 60 espécies inter-férteis que ocorrem quase exclusivamente no hemisfério Norte (THIS *et al.*, 2006) e inclui dois subgêneros: *Euvitis*, ou da videira verdadeira, e *Muscadinia* (WINKLER, 1980; ALLEWELDT e POSSINGHAM, 1988). O subgênero *Euvitis* está composto por mais de 50 espécies que se distribuem na América do Norte, onde vinte espécies apresentam poucos atributos viníferos, com exceção de *Vitis labrusca*, na Europa e na Ásia Ocidental. Na Europa ocidental há apenas uma espécie, *Vitis vinifera*, que apresenta grandes qualidades para a produção de vinho e espumantes, uvas de mesa e uvas passas (WINKLER, 1980; SOUSA, 1996). O subgênero *Muscadinia* compreende três espécies, originadas do sudeste dos Estados Unidos da América e México (*M. munsoniana*, *M. rotundifolia* e *M. popenoeii*); unicamente a espécie *M. rotundifolia* se cultiva nestas regiões para a produção de marmeladas, geleias e sorvetes, para consumo *in natura* e para vinho, pois apresenta sobre tudo um grande interesse para o melhoramento genético, porque é resistente às doenças e à filoxera (REYNIER, 1995).

A uva europeia ou grupo de *V. vinifera* caracteriza-se por uma ampla variabilidade morfológica e fisiológica e tem frutos de excelente qualidade (ALLEWELDT e POSSINGHAM, 1988). Hoje é cultivada em todas as regiões temperadas e tropicais do mundo para frutas frescas, frutas secas, suco e amplamente utilizado na indústria mundial vinhos finos (RIAZ *et al.*, 2004; THIS *et al.*, 2006).

As variedades europeias individualmente adquiriram interesse econômico significativo ao longo do tempo, enquanto que, algumas outras espécies, por exemplo, as Americanas (*V. rupestris*, *V. riparia* ou *V. berlandieri*), adquiriram sua importância no melhoramento, devido à

sua resistência contra patógenos de videira, tal como filoxera, oídio e míldio (TERRAL *et al.*, 2010). As variedades americanas prosperaram no Brasil, pelas suas características vegetativas que melhor se adaptaram às condições ambientais e, principalmente, pela sua resistência às principais moléstias que atacam a videira, e à produção mais volumosa, embora de qualidade inferior, vindo a predominar nas plantações brasileiras em mais de 90% (SANTOS-NETO, 1955). Ainda hoje a maior produção de uvas no país é proveniente de variedades americanas e híbridas.

Enquanto as uvas europeias foram introduzidas em regiões fora do seu habitat natural, eram muitas vezes hibridizadas com espécies de *Vitis* nativas, por exemplo, na América do Norte, América Central e do Japão. Isto resultou em híbridos mais adaptados a ambientes locais e habilitando a viticultura, onde espécies viníferas não poderiam ter sobrevivido devido à sua suscetibilidade às doenças fúngicas ou geadas severas do inverno (ALLEWELDT e POSSINGHAM, 1988). Segundo Sousa (1996), a espécie *V. vinifera* com sua enorme quantidade de variedades é a única de real importância econômica, mas espécies silvestres do gênero *Vitis* têm contribuído, através de cruzamentos interespecíficos, acidentais ou planejados, para a adaptação da videira as mais diferentes condições que a sua expansão tem exigido. Atualmente existem mais variedades de videira de importância econômica provenientes de híbridos que gozam de qualidade entre as variedades europeias e as americanas.

3.2. Importância econômica da cultura

A uva é a mais antiga espécie cultivada pelo o homem, oriunda das regiões do mar Cáspio e das encostas do Cáucaso e cuja domesticação e cultura vêm das mais remotas eras da existência da espécie humana (SOUZA, 1996). As videiras comercializadas dividem-se por a sua utilização em quatro grupos principais e em um grupo secundário; estes grupos são uvas para mesa, para passas, para fabricação de vinhos e para sucos doces e, o grupo secundário, uvas para enlatar (WINKLER, 1980). Podem-se consumir em estado fresco, secas ou prensadas, mas esta diversificação de consumo não é igual em todas as regiões do mundo, já que o consumo é dependente do clima e dos hábitos alimentícios (REYNIER, 1995).

A viticultura é uma atividade muito importante no Brasil, especialmente para os estados localizados no nordeste, sudoeste e sul do

país (HAMADA *et al.*, 2008). Segundo Camargo *et al.* (2011), destacam-se, pelo volume de produção, os Estados do Rio Grande do Sul, São Paulo, Pernambuco, Paraná, Bahia, Santa Catarina e Minas Gerais.

Atualmente a viticultura brasileira, apresenta uma grande diversidade cuja atividade ocupa uma área de aproximadamente 83.700 hectares, com uma produção anual variando entre 1.300.000 e 1.400.000 mil toneladas de uvas. Há uma grande variabilidade no material genético utilizado, sendo mais de 120 cultivares de *V. vinifera* e mais de 40 cultivares de uvas americanas, incluindo as castas de *V. labrusca*, *V. bourquina* e de híbridas interespecíficas (CAMARGO *et al.*, 2011). Segundo Schuck *et al.* (2009), no estado de Santa Catarina, os vinhos são produzidos principalmente a partir de espécies americanas (*V. labrusca*), ou de híbridos adaptados às condições ambientais do estado. Porém, desde 1998, a viticultura em Santa Catarina sofreu intensa transformação, com o crescente uso de variedades européias (*V. vinifera*) ano a ano.

3.3. Principais doenças da videira

As moléstias mais danosas da videira, em escala mundial, são: míldio, oídio, antracnose e podridão negra (WINKLER, 1980). Quando os vinhedos europeus foram atacados por fungos e filoxera (*Phylloxera vastatrix*) na última metade do século 19, foram iniciados programas de melhoramento da videira, com a finalidade de desenvolver cultivares resistentes às doenças *U. necator* e *P. viticola*, que já eram relatadas nos anos 1845 e 1878, respectivamente (ALLEWELDT e POSSINGHAM, 1988). Ambos patógenos, nativos da América do Norte, foram introduzidos juntamente com variedades americanas pelos colonos europeus (OLMO, 1986), causando uma redução progressiva da diversidade de uvas selvagens e cultivadas na Europa (ARNOLD *et al.*, 1998; THIS *et al.*, 2006).

3.3.1. Oídio

O oídio da videira é causado pelo fungo *Erysiphe necator* Schw é um Ascomiceto da ordem Erysiphales e pertence à família Erysiphaceae, cujos sinônimos são [*Uncinula necator* (Schw.) Burr., *E. tuckeri* Berk., *U. americana* Howe e *U. spiralis* Berk. & Curt; anamorfo *Oidium tuckeri* Berk.] (GADOURY *et al.*, 2012). Também conhecido

como míldio pulverulento. É a doença mais prejudicial de videiras em todo o mundo (EIBACH, 1994), reduzindo a produtividade, o crescimento, o vigor, e a qualidade dos frutos ao alterar consideravelmente os níveis de açúcar, a intensidade da cor e aumentar a acidez total (GADOURY *et al.*, 2001; CALONNEC *et al.*, 2004; CAMPBELL *et al.*, 2006). *E. necator* pode sobreviver como conídios (forma assexuada) ou o ascósporos (forma sexuada) (GADOURY *et al.*, 2012). Parece ser que as germinações de conídios são a principal fonte de inóculo da doença (FESSLER e KASSEMAYER, 1995; FATHI e KHIAMI, 2012).

Este fungo invade todos os tecidos tenros da planta. Os brotos e os cachos são atacados, sendo estes os mais prejudicados, nos quais aparece uma eflorescência pulverulenta branco-acinzentado, causada pela formação de inúmeros esporos, que recobre grandes ou pequenas áreas, que exalam um leve cheiro a mofo (WINKLER, 1980; SOUSA, 1996). Nas folhas as frutificações podem ser encontradas na parte superior da folha como círculos acinzentados, podendo também exibir pontos cloróticos. As folhas severamente afetadas às vezes se distorcem e descolorem dando a aparência de murchas, geralmente senescem, desenvolvem manchas necróticas e caem prematuramente (WINKLER, 1980; GADOURY *et al.*, 2012). Os estádios de desenvolvimento compreendidos entre o início da floração e bagas pequenas é o período mais crítico para o desenvolvimento do oídio (CAMPBELL *et al.*, 2006; GADOURY *et al.*, 2012). Quando as bagas são severamente infestadas, interrompe o crescimento do tecido epidérmico, resultando na ruptura da fruta jovem (GADOURY *et al.*, 2012).

Fatores ambientais, incluindo a temperatura e a umidade relativa do ar são muito importante e desempenham papéis críticos na liberação de conídios e ascósporos (FATHI e KHIAMI, 2012). Segundo Carroll e Wilcox (2003) o risco de infecção do oídio está muito relacionado com a umidade relativa, temperatura e maneira de como a informação de condições ambientais é aplicada em programas de manejo da doença em diferentes regiões climáticas. As epidemias causadas por esta doença têm aumentado seriamente nos últimos anos em vinhedos europeus, podendo ser parcialmente devido às condições climáticas favoráveis para o desenvolvimento do patógeno e, da mesma forma, por uma eficácia reduzida de controle químico (STAUDT, 1997).

Segundo Fathi e Khiavi (2012) a temperatura ideal e umidade relativa do ar para a germinação de conídios foram de 25°C e 40-100%, respectivamente. Em temperatura abaixo de 20°C liberação de conídios foi gradualmente reduzida. A temperatura máxima encontrada para

germinação de esporos foi de 34°C, o que foi interrompido quando a temperatura excedeu 34°C. Bendek *et al.* (2007) estimaram que o período de incubação de conídios se dá: de 13 a 14 dias a 20 e 23°C, 19 a 24 dias a 10°C, e sobre 23 dias a 6°C.

Em razão de que esta doença pode ocorrer em regiões onde há temperaturas maiores que 20°C e umidade relativa do ar acima de 60%, é de particular importância para o Brasil. É muito comum observar este patógeno comprometendo o vigor das plantas nas casas de vegetação, cultivos com cobertura, em lugares com períodos de seca prolongados e em todas as zonas com características mais tropicais (climas secos).

Por ser a doença mais comum e destrutiva de videiras em todo o mundo e ser o principal alvo dos fungicidas utilizados em *V. vinifera*, não existe nenhum sistema eficaz para a previsão de epidemias iniciadas por ascósporos, a detecção da doença durante os seus estádios precoces é difícil, principalmente porque aparece pela primeira vez sobre a superfície inferior das folhas (CALONNEC *et al.*, 2004). Embora a aplicação de pesticidas químicos é o método de controle mais comum, o uso de variedades resistentes é a estratégia mais eficaz e ambientalmente saudável para o manejo da doença (KHIAVI *et al.*, 2009; 2012).

3.3.2. Míldio

O míldio da videira é causado pelo oomiceto *Plasmopara viticola* (Berk & Kurt) Berlese & de Toni, pertence à classe Oomycetes, ordem Peronosporales, família Peronosporaceae. Também conhecido como peronóspora, mufa ou mofo, potencial destrutivo (CAFFI *et al.*, 2010). Esta doença é originária da América do Norte, onde sempre ocorreu em videiras selvagens. Sua introdução no Brasil ocorreu conjuntamente com a introdução das videiras americanas em São Paulo (SANTOS-NETO, 1955; GARRIDO e SÔNEGO, 2002). Este patógeno diplóide e biotrófico obrigatório afeta folhas e frutos, causando prejuízos sobre a futura produção, quando provoca a morte de tecidos foliares e desfolha precoce e, conseqüentemente, o enfraquecimento da planta (GARRIDO e SÔNEGO, 2002; MATASCI *et al.*, 2008). A doença é a responsável pelos maiores danos à viticultura no sul do Brasil, com efeitos extremamente danosos à sua produção, provocando grandes perdas caso não sejam adotadas medidas de controle (CZERMAINSKI e SÔNEGO, 2004; HAMADA *et al.*, 2008; PERUCH e BRUNA, 2008).

Na viticultura, a umidade ideal está entre 62% e 68%. Umidade acima de 75%, associada à alta temperatura durante o período

vegetativo, favorece a infecção por míldio, por prolongar o período de molhamento foliar (ROBERTO *et al.*, 2011). Quando valores altos de umidade relativa estão associados às temperaturas elevadas, as doenças fúngicas principalmente o míldio, provocam maiores danos econômicos, podendo inviabilizar a produção (TEXEIRA *et al.*, 2002).

Nos climas úmidos, tanto nas Américas como na Europa, o controle do míldio é baseado na aplicação múltipla de fungicidas (CADLE-DAVIDSON, 2008; CAFFI *et al.*, 2010). Com o cultivo de cultivares europeias (*V. vinifera*), suscetíveis à doença, o uso repetido de fungicidas durante o período de vegetação tornou-se inevitável para proteger o produtor contra o risco de perdas graves. A necessidade de aplicações recorrentes de fungicidas levanta preocupações sobre a segurança ambiental, seja para protetores à base de cobre sintéticos ou fungicidas mais modernos e promove o aparecimento de resistência a estes produtos (KORTEKAMP *et al.*, 2008).

Segundo Czermainski e Sônego (2004), no Brasil são necessárias diversas aplicações de fungicidas para controle do míldio. Produtos a base de cymoxanil + mancozeb e metalaxil + mancozeb e dithianona, de classes toxicológicas mais baixas, foram os mais eficazes no controle da doença na cv. Tannat, independentemente das condições climáticas observadas em cada ano, apresentando maior retorno econômico a aplicação de cymoxanil com mancozeb. Segundo Shimano e Sentelhas (2013), o número de pulverizações empregadas pelo sistema do calendário foi invariavelmente maior do que o necessário para o controle do míldio, da antracnose e das manchas das folhas, o que demonstra que a racionalização do uso de agrotóxicos para controle de doenças fúngicas na videira *V. labrusca* é uma necessidade e deve ser baseada em sistemas que levem em consideração pelo menos dados pluviométricos.

No Brasil, o cultivo protegido com cobertura plástica sobre vinhedos, apresenta-se como uma alternativa na diminuição da incidência de doenças fúngicas em regiões que apresentam excesso de chuvas no desenvolvimento e a maturação dos frutos (CHAVARRIA e SANTOS, 2009), visto que o aumento dos custos de produção tem sido afetado pela intensa necessidade de controle de doenças fúngicas (ROBERTO *et al.*, 2011). A utilização de cobertura plástica sobre as fileiras de plantas ocasiona modificações no microclima junto às videiras, cujas alterações propiciam condições favoráveis ao crescimento e incremento da produtividade (CHAVARRIA e SANTOS, 2009).

O emprego desse tipo de procedimento é uma alternativa válida para a minimização do molhamento da parte aérea da videira causado pela chuva e pode reduzir a ocorrência e severidade do míldio, permitindo reduzir o número de pulverizações de fungicidas em até 75% em relação à tela antigranizo (outro método) (GENTA *et al.*, 2010). Num estudo CHAVARRIA *et al.* (2007) mencionam que a cobertura plástica aumentou a temperatura diurna próxima ao dossel vegetativo, não influenciou na umidade relativa do ar, diminuiu a radiação fotossinteticamente ativa e a velocidade do vento e restringiu drasticamente a água livre sobre as folhas e cachos. Nessas condições, o cultivo protegido não permitiu o estabelecimento de míldio e diminuiu a incidência e a severidade de podridões de cacho, devido à alteração microclimática. Estas alterações microclimáticas de ambiente quente e seco no vinhedo favorecem a germinação dos conídios do oídio pela luz difusa (CRUZ, 2001). Os focos de oídio em videiras sob cultivo protegido ainda requerem o uso de pulverizações de fungicidas (CHAVARRIA *et al.*, 2007; GENTA *et al.*, 2010).

3.4. Fontes de resistência

As diversas espécies do gênero *Vitis* não reagem aos patógenos de forma similar. Em geral, as cultivares de *V. vinifera* são bastante suscetíveis a patógenos e pragas, enquanto que as cultivares americanas (*V. labrusca*), híbridas e outras espécies de *Vitis* são tolerantes ou mesmo resistentes a patógenos (OLIVEIRA *et al.*, 2005). Em vários países ao redor do mundo os programas de melhoramento genético visam o desenvolvimento de novos cultivares resistentes ao míldio e ao oídio. Deste modo, é fundamental que fontes de resistência sejam caracterizadas para o seu melhor uso no melhoramento genético.

Depois que as pragas e doenças foram introduzidas na Europa e destruíram muitos dos vinhedos, espécies americanas foram testadas na Europa e utilizadas em hibridizações com cultivares viníferas, gerando uma série de novas cultivares híbridas que são utilizados atualmente nos vinhedos de quase tudo o mundo (WINKLER, 1980). As espécies americanas desenvolveram resistência a essas pragas e doenças porque co-evoluíram com as mesmas, e *M. rotundifolia* é considerada como tendo a mais forte resistência (OLMO, 1986). Todas as fontes de resistência para esses patógenos são espécies selvagens de baixa qualidade enológica (ADAM-BLONDON *et al.*, 2004).

A combinação da resistência de espécies americanas com *V. vinifera* tornou-se uma importante estratégia para combater as doenças

fúngicas (FISHER *et al.*, 2004). Um grande problema, porém, é o longo tempo necessário para produzir uma nova cultivar que reúna resistência e alta qualidade do vinho. Várias gerações de retrocruzamentos com cultivares de *V. vinifera* são necessários, a fim de recuperar os atributos de qualidade (ADAM-BLONDON *et al.*, 2004; KORTEKAMP *et al.*, 2008).

Tais recursos genéticos têm sido usados durante décadas como doadores para cruzamentos resultando na obtenção de novas cultivares resistentes (KORTEKAMP *et al.*, 2008). Jürges *et al.* (2009) avaliaram a resposta do hospedeiro ao míldio em *Vitis* da América, Ásia e Europa, mediante inoculação de discos foliares, onde encontraram inibição à doença nas espécies da América do Norte e Siberianas. Verificaram também que o sucesso da colonização prevaleceu nas anfitriãs europeias e hifas foram encontradas na superfície das espécies Siberianas não-asiáticas. Assim também KHIAMI *et al.* (2012), no Irã, avaliando variedades de videiras procurando resistência ao oídio, encontraram resultados promissores e cultivares imunes, altamente resistentes a esta moléstia, podendo ser usados como fonte de resistência genética em programas de melhoramento genético da videira.

3.5. Uso de Microsatélites ou sequencias simples repetidas (SSR) no melhoramento de plantas

Os marcadores moleculares são características genéticas entre indivíduos ou espécies, e geralmente eles não representam os genes-alvo, mais atuam como "sinais" ou "marcas", devido a estarem localizados na proximidade de genes de interesse, ou seja, estão fisicamente ligados. Também não afetam o fenótipo da característica de interesse (COLLARD *et al.*, 2005). Estas são marcas herdáveis e passíveis de utilização na seleção de plantas. Entre as aplicações dos marcadores moleculares no melhoramento vegetal, está a seleção assistida de características de importância agrônômica, a qual se fundamenta no mapeamento e associação de marcadores moleculares a genes que controlam essas características de interesse (OLIVEIRA *et al.*, 2005).

O uso de marcadores moleculares viabiliza a caracterização genética de um grande número de genótipos, através de procedimentos relativamente rápidos. A detecção de marcadores ligados a genes de interesse agrônômico permite a seleção de genitores superiores em programas de melhoramento de forma objetiva e precisa, determinando a formação de populações segregantes com alta frequência de genótipos

superiores (BERED, 1997). Comparados com os caracteres morfológicos, os marcadores moleculares que detectam polimorfismos no nível do DNA tem a vantagem de ser neutros frente ao ambiente, possuem um maior poder discriminativo e são altamente reproduzíveis, detectáveis em todas as fases de crescimento da planta (FRANCIA *et al.*, 2005; MARTÍNEZ *et al.*, 2006).

Uma classe de marcadores moleculares que tem sido amplamente utilizada nos últimos anos são os microssatélites, também conhecidos como sequências simples repetidas ou *simple sequence repeats* (SSR). São regiões de sequências pequenas (dois a seis pares de bases), repetidas em tandem, organizadas em série e distribuídas aleatoriamente pelo genoma. Estas sequências são altamente variáveis, pois sofrem alta taxa de mutação, e estão dispersas em muitos sítios nos genomas de fungos, plantas e animais, aos quais podem ou não estar associados com genes (AZOFEIFA-DELGADO, 2006). São marcadores amplamente utilizados em estudos genéticos, incluindo a conservação genética, genética de populações, melhoramento genético e testes de paternidade. Esta gama de aplicações é devida ao fato destes apresentarem herança mendeliana, serem codominantes, apresentarem alto nível de polimorfismo, serem altamente reproduzíveis, terem alta resolução e serem baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR) (OLIVEIRA *et al.*, 2006; TROGGIO *et al.*, 2007).

Segundo Oliveira *et al.* (2006) os microssatélites são classificados de acordo com o tipo de sequência repetida em perfeito, imperfeito, interrompido ou composto. Em um microssatélite perfeito, a sequência de repetição não é interrompida por qualquer base que não pertencem ao padrão (por exemplo, TATATATATATATATA), enquanto que em um microssatélite imperfeito há um par de bases entre os motivos repetidos que não correspondem à sequência motivo (por exemplo, TATATATACTATATA). No caso de um microssatélite interrompido, há uma pequena sequência dentro da sequência repetida que não coincide com a sequência motivo (por exemplo, TATATACCGTGTATATATATA), enquanto que em um microssatélite composto contém a sequência de duas repetições de sequências distintas e adjacentes (por exemplo, TATATATATAGTGTGTGTGT).

Na videira, uma das maiores aplicações dos marcadores microssatélites é a identificação e discriminação de cultivares, a fim de facilitar a gestão das coleções e controlar o comércio de material vegetal com uma correta identificação de cultivares (SEFC *et al.*, 2000; THIS *et al.*, 2004). Por exemplo, os microssatélites atualmente têm sido utilizados com sucesso na identificação de clones na Itália (VIGNANI *et*

al., 1996), na Espanha (CARCAMO *et al.*, 2010), na Argentina (MARTÍNEZ *et al.*, 2006a) e no Brasil (SCHUCK *et al.*, 2010; LEÃO *et al.*, 2011).

Além do mais, estes marcadores podem ser utilizados para identificar as sinonímias e homonímias das cultivares de vários países com tradição ancestral no cultivo da videira. Na Turquia tem sido empregado para preservar o potencial genético da videira, a fim de descrever uma nomenclatura razoável e determinar as relações entre variedades (KARATAS *et al.*, 2007). Na Espanha foram usados para identificar *Vitis* autóctones visando à conservação da diversidade dos recursos fitogenéticos de videira e torná-lo disponíveis em bancos de germoplasma (MORENO-SANZ *et al.*, 2011). Na Argentina foi caracterizada a variabilidade genética e o relacionamento de variedades de videiras crioulas peruanas e argentinas (MARTÍNEZ *et al.*, 2006b). No Brasil, 221 acessos de videira da Embrapa Semi-Árido (Bahia) foram caracterizados com o uso dos SRSs, cujos resultados permitiram a integração de dados de perfis de *fingerprint* com características morfológicas para estabelecer a correta identificação de cultivares, identificar erros de nomenclatura e identificar um conjunto de acessos únicos que não correspondem as cultivares em bases de dados internacionais de referência (LEÃO *et al.*, 2009). Também tem-se utilizado na análise de genótipos para discriminar corretamente os acessos de videira em uso no estado de Santa Catarina (SCHUCK *et al.*, 2009).

3.6. Mapeamento de QTLs

Muitas características agronomicamente importantes, como produtividade, qualidade e algumas formas de resistência a doenças são controladas por muitos genes e são conhecidos como caracteres quantitativos (ou também características poligênicas, multifatoriais ou complexas). As regiões genômicas que contêm os genes associados a uma característica quantitativa em particular, são conhecidas como locos de características quantitativas (QTL) (COLLARD *et al.*, 2005).

Segundo DOLIGEZ *et al.* (2006), um mapa genético baseado em SSR, densamente coberto, permite: (1) selecionar marcadores abrangendo alguma região de particular interesse para a clonagem de genes (*positional cloning*) ou seleção assistida por marcadores moleculares; (2) escolher um lote de marcadores homogeneamente distribuídos ao longo do genoma para a construção de mapas genéticos de enquadramento em qualquer outro cruzamento útil para a detecção de

QTLs ou para uma avaliação de germoplasma baseada no desequilíbrio de ligação; (3) comparar a localização genômica dos genes/QTLs responsáveis por uma dada variação fenotípica em populações diferentes, e (4) integrar mapas genéticos e físicos.

A fim de gerar um conjunto de marcadores codominantes para estudos genéticos da videira, 21 grupos de pesquisa formaram um consórcio internacional para identificar marcadores microssatélites na videira (VMC, *Vitis* Microsatellite Consortium, coordenado pelo AGROGENE, Moissy Cremayel, França) (WELTER *et al.*, 2007). Assim, também na França foram desenvolvidos 169 novos marcadores microssatélites (VVI), representando um novo e informativo conjunto de marcadores para estudos genéticos na videira (MERDINOGLU *et al.*, 2005). Na Itália Di Gaspero *et al.* (2005) desenvolveram 118 microssatélites (UDV) em *V. vinifera*.

Estes marcadores têm sido amplamente utilizados no mapeamento genético da videira, o que têm contribuído na identificação de várias regiões genômicas com efeitos importantes em relação à resistência genética ao míldio e ao oídio da videira (BARKER *et al.* 2005; WIEDEMANN-MERDINOGLU *et al.*, 2006; WELTER *et al.*, 2007; BELLIN *et al.*, 2009; SCHWANDER *et al.*, 2012; VENUTI *et al.*, 2013).

Em *M. rotundifolia*, a resistência genética ao oídio da videira é controlada por um único alelo *Run1*¹ dominante no loco *Run1*² presente na espécie selvagem, mas ausente em *V. vinifera* (BARKER *et al.*, 2005). Segundo Pauquet *et al.* (2001) este alelo foi introduzido em *V. vinifera*, utilizando a estratégia do retrocruzamento dos F₁ com diferentes variedades viníferas usadas para produção de vinho. Na procura por marcadores moleculares ligados ao *Run1*, foi realizado o mapeamento genético da população Mtp3294 (VRH3082-1-42 × Cabernet Sauvignon). Nesta população de 157 indivíduos do quinto ciclo de retrocruzamento, identificaram-se 13 marcadores ligados ao gene de resistência *Run1*, confirmando a informação na análise fenotípica, onde foram encontrados ausentes em todos os genótipos suscetíveis e presentes em todos os indivíduos resistentes. Assim também, Barker *et al.* (2005) utilizou três populações no estudo de mapeamento: Mtp3294 (VRH3082-1-42 x *V. vinifera* cv. Cabernet Sauvignon; 161 indivíduos), Mtp3322 (VRH3176-21-11 x *V. vinifera* cv. Cabernet Sauvignon; 419 indivíduos) e Mtp3328 (*V. vinifera* cv.

¹ Não itálico o alelo de resistência

² Em itálico o loco de resistência

Marselan x VRH3082-1-49; 416 indivíduos), e localizaram o loco *Run1* entre os marcadores microssatélites VMC4f3.1 e VMC8g9 e, como tal, está localizado numa região equivalente ao cromossomo 12. O alelo *Rpv1* que confere resistência ao míldio está localizado no cromossomo 12 de *M. rotundifolia* e está geneticamente associado ao alelo *Run1* (BARKER *et al.*, 2005; WIEDEMANN-MERDINOGLU *et al.*, 2006).

O mapeamento da população F_1 (144 plantas), proveniente do cruzamento das cultivares de *V. Vinifera*, ‘Regent’ (tem vários componentes de resistência a doenças fúngicas herdados como características poligênicas) x ‘Lemberger’ (cultivar tradicional suscetível aos fungos) (FISHER *et al.*, 2004; WELTER *et al.*, 2007), permitiu a identificação de vários QTLs de resistência contra *E. necator* e *P. viticola*. O loco *Ren3*, que confere resistência ao oídio, foi detectado no cromossomo 15. Este loco de resistência apresentou efeitos significativos nas avaliações de resistência nas folhas e nas bagas, explicando 56,8% e 64,5% da variação fenotípica, respectivamente (WELTER *et al.*, 2007). Na mesma população, foram identificados vários QTLs para resistência ao míldio. O principal QTL foi o loco *Rpv3*, localizado no cromossomo 18, mostrando efeitos significativos em todos os anos avaliados, tanto na folha, quanto na baga (WELTER *et al.*, 2007).

Por outro lado, Bellin *et al.* (2009) realizaram ensaios de inoculação de discos foliares com dois isolados de míldio coletados em vinhedos italianos e franceses em plantas de uma população de 116 indivíduos proveniente do cruzamento entre ‘Chardonnay’ (susceptível ao míldio) x ‘Bianca’ (manteve resistência, originalmente presente de seus ancestrais norte-americanos através de vários ciclos de retrocruzamento com cultivares suscetíveis de *V. vinifera*). No referido trabalho foram feitas classificações de resistência e identificação histológicas da fase de interação, quando o desenvolvimento do patógeno prejudicava os indivíduos resistentes. Os autores encontraram que o parental ‘Bianca’ e 59% da sua descendência foram heterozigóticas para um gene dominante, localizado a 2,9 cM do *Rpv3*, localizado no cromossomo 18. O gene é responsável pelo aparecimento de uma resposta de hipersensibilidade (HR) aos sítios de infecção dentro de 2 dias após a inoculação (dpi).

Segundo Casagrande *et al.* (2011), a incorporação de alelos favoráveis no material de melhoramento proporcionaria uma estrutura genética mais apropriada, em que os genes R dominantes podem ser transferidos, já que estes genes explicam uma porção significativa do fenótipo de resistência. O alelo *Rpv3* está associado com a capacidade

de montar uma resposta localizada de hipersensibilidade (HR), a qual se manifesta após o início da infecção de *P. viticola*.

Posteriormente, outros locos de resistência contra o míldio da videira foram identificados: *Rpv8* (BLASI *et al.*, 2011), *Rpv10* (SCHWANDER *et al.*, 2012) e *Rpv12* (VENUTI *et al.*, 2013), todos provenientes de *V. amurensis*, uma espécie silvestre do pool genético de *Vitis* asiático. Assim, também RAMMING *et al.* (2011), avaliando populações segregantes de resistência ao oídio do cruzamento entre *V. vinifera* × *V. romanetii* determinaram a presença de um único loco dominante, *Ren4*, conferindo resistência ao oídio da videira.

Desta forma este conjunto de estudos disponibilizaram marcadores moleculares ligados a locos de resistência a doenças, oportunizando o desenvolvimento de estratégias de seleção assistida por marcadores moleculares (SAM), o que permite acelerar o processo de melhoramento genético da videira contra doenças (EIBACH *et al.*, 2007).

3.7. Seleção assistida por marcadores

A seleção assistida por marcadores (SAM) é uma forma de seleção indireta, na qual o caráter indireto apresenta herdabilidade igual a 100%, uma vez que marcadores moleculares não são influenciados pelo ambiente (BERED, 1997). Assim, a seleção indireta tem potencial para aumentar a eficiência de seleção por permitir avaliação e seleção antecipada e por reduzir o tamanho da população de plantas usada durante a seleção. Para espécies perenes, é uma metodologia extremamente atraente, tendo em vista o tempo necessário para completar uma geração ou ciclo de melhoramento de tais espécies (OLIVEIRA *et al.*, 2005).

Esta estratégia SAM envolve a presença ou ausência de um marcador ou alelo, como um substituto para auxiliar na seleção fenotípica de uma forma que pode torná-lo mais eficiente, eficaz, confiável e de baixo custo em comparação com a metodologia de melhoramento de plantas mais convencional (COLLARD *et al.*, 2005). Oferece vantagens únicas na escolha correta de genótipos elites, a fim de melhorar as características para as quais são de baixa herdabilidade ou existem limitações das tecnologias de fenotipagem (DI GASPERO e CATTONARO, 2010). A SAM é especialmente útil quando o gene alvo é verdadeiramente único e há poucas alternativas para obter fenótipos desejados, tais como no caso da resistência a doença monogênica (GILL-LANGARICA e MAYEK-PÉREZ, 2008). Envolve a seleção

indireta de características através da seleção do marcador ligado ao gene de interesse (JOSHI e NAYAK, 2010).

As vantagens da SAM são (i) economia de tempo em comparação com ensaios de campo complexos (que precisa ser realizado em determinadas épocas do ano ou em locais específicos, ou de trabalho intensivo); (ii) eliminação da avaliação fenotípica pouco confiável associada ao campo, devido aos efeitos ambientais; (iii) a seleção de genótipos em fase de plântula; (iv) piramidação de genes ou combinação de múltiplos genes simultaneamente, evitando a transferência de genes indesejáveis ou prejudiciais; (v) seleção para características de baixa herdabilidade e (vi) testes para características específicas, cujas medições fenotípicas não são viáveis (WU e WANG, 2011).

Segundo Francia *et al.* (2005), para os melhoristas de plantas, a aplicação mais útil da SAM é a utilização de marcadores baseados em DNA tendo basicamente três finalidades: rastrear o alelo favorável (dominante ou recessivo) ao longo de gerações a fim de acumular alelos favoráveis; identificar os indivíduos mais adequados entre progênes segregantes, com base na composição alélica de uma parte ou de todo o genoma e quebrar a possível ligação de alelos favoráveis com locos indesejáveis.

O principal objetivo dos programas de melhoramento de plantas comerciais é o aumento de rendimento. Em geral isto tem sido conseguido através do aumento da frequência de alelos benéficos no melhoramento através da seleção fenotípica, em vez da genotípica (MAZUR e TINGEY, 1995). Segundo Eibach *et al.* (2007), a aplicação da SAM para a resistência ao míldio conduz a uma pirâmide de genes de resistência, e a comparação dos dados fenotípicos com os resultados das análises de marcadores moleculares mostraram uma clara correlação entre o grau de resistência e a presença de alelos de resistência relacionados.

As melhores oportunidades de sucesso da SAM estão no melhoramento para resistência às doenças, onde a piramidação de genes é desejável na mesma cultivar com menos ciclos de seleção (JOSHI e NAYAK, 2010; WU e WANG, 2011).

3.8. Piramidação de genes de resistência

No melhoramento para resistência às doenças, o acúmulo de genes para construir-se uma pirâmide genética é sugerido como uma estratégia duradoura (NELSON, 1978; KELLY *et al.* 1994; ALZATE-MARIN *et al.*, 2005), cujo processo é longo e dispendioso, semelhante

ao desenvolvimento de uma variedade (PEDERSEN e LEATH, 1988). Os métodos de melhoramento para piramidar genes de resistência compreendem geralmente cruzamentos, retrocruzamentos e cruzamentos de testes destinados a verificar a presença de uma combinação desejada destes genes na descendência resultante (KELLY *et al.*, 1994).

As seguintes etapas são fundamentais no desenvolvimento de um programa de “piramidação de genes de resistência auxiliado por marcadores moleculares”: (1) seleção de genitores contrastantes para genes de resistência às doenças de interesse e identificação das raças do patógeno de maior importância para a região para a qual se destinam as novas variedades; (2) estudos de herança da resistência às raças selecionadas a partir de cruzamentos entre as fontes de resistência e a cultivar suscetível de interesse, (3) identificação de marcadores moleculares ligados aos diferentes alelos de resistência e (4) desenvolvimento de isolinhas por meio de retrocruzamentos (ALZATE-MARIN *et al.*, 2005).

Se vários genes estão sendo incorporados e todos eles conferem resistência completa ao mesmo patógeno, a presença de um fator de resistência mascara o efeito fenotípico dos demais (MILACH e CRUZ, 1997). Assim, este processo torna-se mais eficiente pelo uso de marcadores moleculares estreitamente ligados aos genes de resistência, selecionando assim indiretamente e na ausência do agente patogênico, a presença desses genes responsáveis pela resistência (KELLY *et al.*, 1994). É importante notar que a utilização de marcadores moleculares é uma ferramenta que ajuda a acelerar o processo da piramidação de genes, mas não substitui as técnicas convencionais de melhoramento, sendo necessário continuar explorando a complementaridade entre melhoramento clássico e o assistido com ferramentas biotecnológicas (GARZÓN *et al.*, 2007).

O desenvolvimento de cultivares com múltiplos genes de resistência pode reduzir a probabilidade de mutação simultânea do patógeno. No entanto é difícil a piramidação de genes utilizando abordagens de melhoramento convencional, devido aos efeitos epistáticos dos genes que regulam a resistência, entretanto, a disponibilidade de marcadores moleculares para diferentes genes de resistência irá permitir a identificação de plantas que transportam os diferentes genes (KELLY *et al.*, 1994; CARANTA *et al.*, 1999; TAR'NA *et al.*, 2003). O uso dos marcadores moleculares, portanto, torna-se verdadeira ferramenta no monitoramento da introgressão da resistência em variedades de interesse, tornando disponível não somente a piramidação de genes, como também auxiliando no melhor

entendimento dos mecanismos genéticos presentes nas fontes de resistência (FERREIRA *et al.*, 1999).

Com o aumento da aplicação de marcadores baseado PCR, a seleção assistida por marcadores, sem dúvida se tornou uma ferramenta mais viável no melhoramento de plantas (FRANCIA *et al.*, 2005; JOSHI e NAYAK, 2010; WU e WANG, 2011), sendo usado como uma estratégia da piramidação de genes em várias culturas.

Na Colômbia, Tapiero *et al.* (2003) visando a resistência genética a *Piricularia grisea* Sacc em arroz, utilizaram os genes Pi-1 e Pi-2, obtendo linhas com genes piramidados mediante cruzamentos de duas linhas isogênicas. A presença e a condição homozigota dos genes de resistência nas novas linhas foram estabelecidas através de marcadores moleculares. O comportamento das pirâmides foi avaliado em câmaras de crescimento, com isolados representativos da doença e também a campo, numa região dedicada tradicionalmente a produção de arroz onde as epidemias da piricularia eram frequentes. Tanto nas inoculações artificiais, como nas áreas de cultivo, as pirâmides conservaram a resistência ao patógeno. Contra esta mesma doença, foram piramidados os genes Pi-1, Piz-5 e Pita por Hittalmani *et al.* (2000). Os autores verificaram que as plantas que transportavam as combinações de dois ou três genes, foram testadas quanto à resistência à brusone nas Filipinas e Índia, resultando que combinações incluindo *Piz-5* apresentaram maior resistência do que quando somente o referido gene estava presente.

Em feijão, Kelly *et al.* (1994) conseguiram com sucesso a piramidação dos genes Up-2, Ur-3, e B-190, os quais conferem resistência à ferrugem. A identificação de marcadores moleculares ofereceu a oportunidade de piramidar os genes de resistência mais eficientes em genótipos específicos. Também, Kelly *et al.* (1995) piramidaram cinco genes de resistência (I, be-u, be-1², be-2², be-3) contra o vírus do mosaico comum do feijoeiro (BCMV). Assim também, Ragagnin *et al.* (2003), na cultura de feijão testaram a piramidação de genes de resistência contra a ferrugem, a antracnose e a mancha-angular no background “carioca” Rudá. Os autores determinaram o espectro de resistência de isolinhas a diferentes patótipos a fim de selecionar as linhagens mais similares aos progenitores doadores quanto à sua resistência. Comparando-se os espectros de resistência dos progenitores doadores e das isolinhas deles derivadas, os autores verificaram que as isolinhas TO-41-5-6-24, AB-74-1-18, ON-25-99 e AND-7-2-9-4-6 apresentaram essencialmente os mesmos genes de resistência presentes em seus progenitores.

Em soja, Shi *et al.* (2009) conseguiram a piramidação de três locos de resistência (*Rsv1*, *Rsv3*, e *Rsv4*) para o vírus do mosaico de soja (SMV). Os múltiplos genes desempenham um papel importante na prevenção de quebra da resistência genética, devido à ocorrência de novas cepas virulentas. Também, Maphosa *et al.* (2012), mediante a utilização de seleção assistida por marcadores conseguiram a piramidação em homossigoze dos genes *Rpp2* e *Rpp3* o que aumentou claramente a resistência contra a ferrugem-asiática, com as das duas combinações de genes.

Em milho, visando a piramidação de genes de resistência para Helmintosporiose comum (*Exserohilum turcicum*) e Carvão do pendão (*Sphacelotheca reiliana*) Min *et al.* (2012) encontraram que as linhas que transportam os genes de resistência HT1, HT2 e QTL para *S. reiliana*, apresentaram alto nível de resistência e rendimento, sugerindo que a estratégia de seleção assistida pode ser usado efetivamente para selecionar o nível de alto rendimento e resistência nos materiais de reprodução em milho.

Em trigo, três combinações de genes de resistência (Pm2 + Pm4a; Pm2 + Pm21; Pm4a + Pm21) contra oídio foram integrados com sucesso na cultivar elite 'Yang158', ilustrando as perspectivas para a utilização de marcadores moleculares no melhoramento para resistência da doença (LIU *et al.*, 2000). Outros estudos da piramidação de genes para várias características agronômicas em diversas culturas são relatados: em centeio (TWARDOWSKA *et al.*, 2005), em tomate (SACCO *et al.*, 2013) e em pepino (ROBBINS *et al.*, 2008).

Em outro estudo de piramidação de genes de resistência Gb2, Gb3 e Gb6 para o pulgão-verde (Homoptera: Aphididae) em trigo, avaliando diferentes biótipos de pulgões nas reações das plantas piramidadas com os genes Gb2/Gb3, Gb2/Gb6 e Gb3/Gb6. Ao ser comparadas com as plantas carregando os genes de resistência individuais, a piramidação não forneceu proteção adicional sobre aquele conferido pelos genes de resistência individuais (PORTER *et al.*, 2000).

Assim também, Zhang *et al.* (2010), mediante métodos de melhoramento convencional combinado com SAM, identificaram dezessete linhas homozigotas carregando os genes o2 e o16 combinados, relacionados com a alta produção de lisina em milho. Por sua parte, Yang *et al.* (2013) piramidaram os genes waxy (wx) associado com maior teor de amilopectina no endosperma e melhor sabor e o gene opaque-16 (o16), relacionado com maior teor de lisina no endosperma e melhor valor nutricional, com o que, obtiveram resultados significativos na melhoria da qualidade do milho.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material vegetal

Das linhas de melhoramento 2000-305-134 (uvas tintas) e 2000-305-97 (uvas brancas) foram obtidas duas populações segregantes por polinização aberta entre plantas F₁ oriundas do mesmo cruzamento. As duas variedades são irmãs germanas, provenientes do cruzamento entre VHR 3082-1-42 x Regent (Figura 1) e contêm os locos de resistência *Rpv1/Run1*, *Ren3* e *Rpv3* piramidados e em heterozigose. Da primeira planta foi obtida uma progênie de 420 plantas, denominada de UFSC-2013-1 e da segunda uma progênie de 217 plantas, denominada de UFSC-2013-2, totalizando 637 plantas.

O parental VHR 3082-1-42 foi obtido do cruzamento entre *Muscadinia rotundifolia* x *Vitis vinifera*, seguido de quatro retrocruzamentos com variedades viníferas e carrega os alelos de resistência *Rpv1/Run1* (PAUQUET *et al.*, 2001; BACKER *et al.*, 2005). No parental Regent foram identificados os locos de resistência *Ren3* e *Rpv3* conferindo resistência complexa ao oídio e ao míldio, respectivamente (WELTER *et al.*, 2007).

As progênies foram plantadas em vasos de 5 L e acomodadas em casa de vegetação. As análises genéticas foram realizadas no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDGV)/CCA/UFSC e os ensaios de resistência foram realizados no Laboratório de Genética e Biotecnologia do Campus Curitibanos/UFSC.

Nas populações experimentais, com base na segregação Mendeliana são esperadas nove combinações genótípicas para o míldio: (1) *Rpv1/Rpv1*, *Rpv3/Rpv3*; (2) *Rpv1/Rpv1*, *rpv3/rpv3*; (3) *Rpv1/Rpv1*, *Rpv3/rpv3*; (4) *Rpv1/rpv1*, *Rpv3/Rpv3*; (5) *Rpv1/rpv1*, *Rpv3/rpv3*; (6) *Rpv1/rpv1*, *rpv3/rpv3*; (7) *rpv1/rpv1*, *Rpv3/rpv3*; (8) *rpv1/rpv1*, *Rpv3/Rpv3* e (9) *rpv1/rpv1*, *rpv3/rpv3*). Assim também para o oídio: (1) *Run1/Run1*, *Ren3/Ren3*; (2) *Run1/Run1*, *ren3/ren3*; (3) *Run1/Run1*, *Ren3/ren3*; (4) *Run1/run1*, *Ren3/Ren3*; (5) *Run1/run1*, *Ren3/ren3*; (6) *Run1/run1*, *ren3/ren3*; (7) *run1/run1*, *Ren3/ren3*; (8) *run1/run1*, *Ren3/Ren3* e (9) *run1/run1*, *ren3/ren3*) e na avaliação da combinação de todos os locos estudados são esperados 27 combinações genéticas e oito fenótipos são produzidos: (1) *Rpv1/Run1*, *Ren3*, *Rpv3*; (2) *Rpv1/Run1*, *Ren3*, *rpv3*; (3) *Rpv1/Run1*, *ren3*, *Rpv3*; (4) *Rpv1/Run1*, *ren3*, *rpv3*; (5) *rpv1/run1*, *Ren3*, *Rpv3*; (6) *rpv1/run1*, *Ren3*, *rpv3*; (7) *rpv1/run1*, *ren3*, *Rpv3* e (8) *rpv1/run1*, *ren3*, *rpv3*).

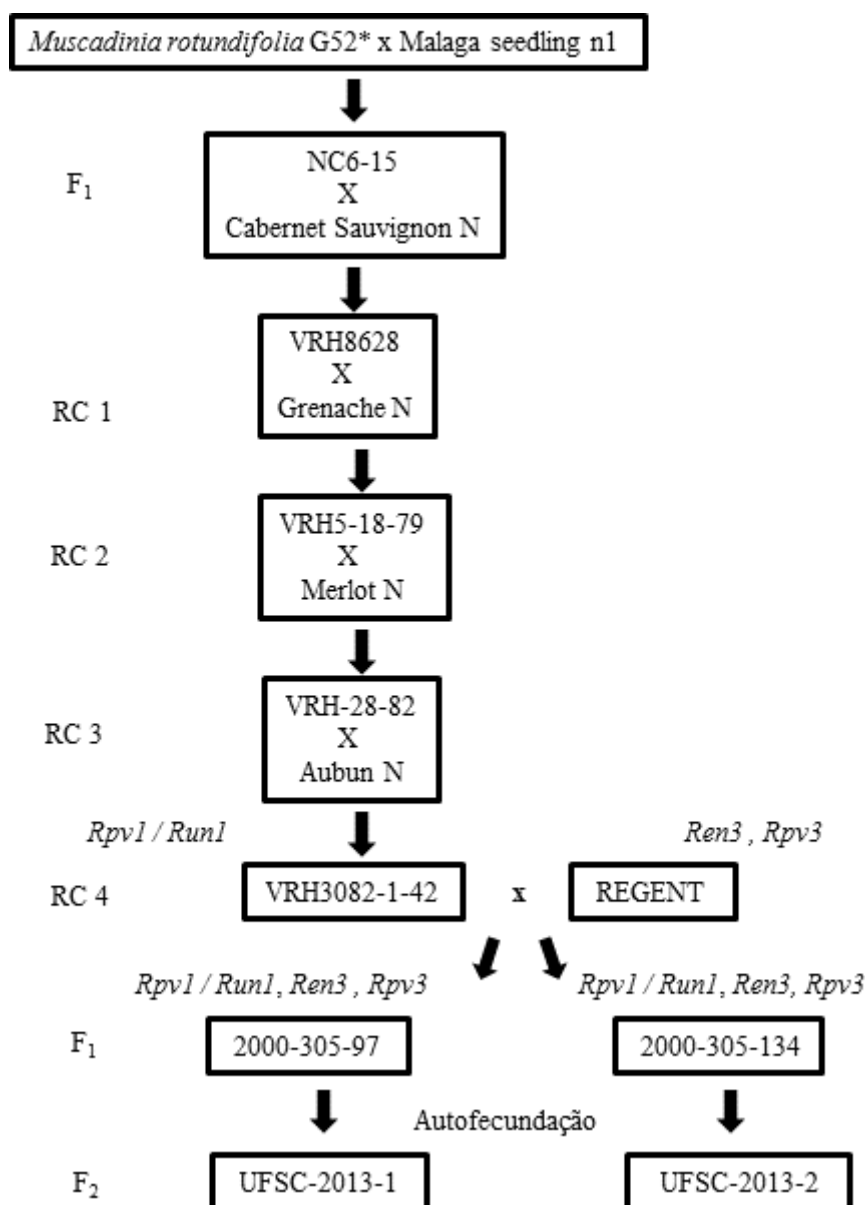


Figura 1. Diagrama de representação da piramidação de genes de resistência. Adaptado de Pauquet *et al.* (2001) e Eibach *et al.* (2007).

4.2. Avaliação genética

4.2.1. Extração e quantificação de DNA

O DNA das plantas foi extraído a partir de 80 - 100 mg de folhas dissecadas em sílica gel. As amostras foram maceradas no homogeneizador Precellys® 24 em tubos de 2 mL (self-standing microtube, Bertin Technologies) com quatro esferas de cerâmica de 2,8 mm, durante dois ciclos de agitação por 30 s a 5000 rpm. Posteriormente, foi utilizado o kit de extração NucleoSpin® Plant II de acordo com as recomendações do fabricante. O DNA das amostras foi quantificado com o espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific). O DNA foi diluído para uma concentração de 1 ng.µL⁻¹ para uso nas reações.

4.2.2. Amplificação dos marcadores microssatélites via PCR

Na genotipagem foram utilizados os marcadores microssatélites Sc34_8 e Sc35_2, que flanqueiam os locos *Rpv1/Run1*, localizados no cromossomo 12, os marcadores GF15-28 e GF15-30 localizados no cromossomo 15, que flanqueiam o loco *Ren3* e os marcadores GF18-06 e GF18-08, localizados no cromossomo 18, que flanqueiam o loco *Rpv3*. Os marcadores foram gentilmente cedidos pelo pesquisador Dr. Ruldfolf Eibach. Os seis marcadores microssatélites foram combinados em multiplex e amplificados via PCR (*Polymerase Chain Reaction*). As reações foram realizadas em volume final de 5 µL, utilizando o kit KAPA 2G (Kapa Biosystems, Inc. Boston, USA). O mix foi composto por 1x de KAPA Fast Multiplex Mix, seis pares de iniciadores na concentração de 0,01 µM. O iniciador *forward* (5') de cada par de iniciadores foi marcado com as fluorescências 6-FAM, VIC e PET.

As reações de PCR foram realizadas em termociclador C-1000™ Thermal Cycler (Biorad), utilizando-se a seguinte programação: 94°C durante 3 min; 30 ciclos de amplificação a 94°C por 30 s, 60°C por 30 s e 72°C por 1 min; e extensão final de 72°C por 40 min. Inicialmente, 5 µl de produto da PCR foi utilizado para eletroforese em gel de agarose 1,5% e visualizados em fotodocumentador de UV para confirmar a amplificação.

4.2.3. Genotipagens no Applied Biosystems 3500 XL

Os produtos das reações de PCR (1 µL) foram diluídos em 27 µL de água ultrapura autoclavada. Para a corrida no sequenciador, utilizou-se um volume final de 10 µL. Sendo 1 µL da reação da PCR diluída, 0,5 µL do marcador Gene Scan 600 LIZ (Life Technologies) e 8,5 µL de formamida (Life Technologies). Os alelos foram separados por eletroforese capilar utilizando o sequenciador 3500 XL Applied Biosystems com o polímero POP-7. O tamanho dos alelos foram definidos com a utilização do software Gene Mapper Versão 4.1 (Applied Biosystems) em comparação com o padrão gene scan 600 Liz (Life Technologies).

4.3. Avaliação fenotípica

4.3.1. Avaliação para o míldio

Foram realizadas inoculações em discos foliares para avaliação fenotípica do oomiceto. Todo o material utilizado nas inoculações, exceto o inóculo, foi autoclavado a 120°C e 1,1 atm por 19 min. No experimento foram utilizadas 142 plantas, sorteadas em proporções iguais, das nove combinações alélicas obtidas.

Foi estabelecido um experimento inteiramente casualizado (DIC) com três repetições. De todas as plantas avaliadas, foi coletada a 4ª folha do ápice para a base da planta. As folhas foram esterilizadas em hipoclorito de sódio (1% de cloro ativo) por 30 s e, posteriormente, efetuada a tríplice lavagem em água ultrapura (Milli-Q®), com os tempos de 30 s, 30 s e 60 s, respectivamente. Em câmara de fluxo laminar foram recortados seis discos foliares de 12 mm de cada folha e colocados em placa de Petri de vidro com a face inferior voltada para cima, sobre papel filtro umedecido, para produzir uma câmara úmida para a proliferação do patógeno. Aplicou-se, por disco foliar, uma gotícula de 30 µL de uma suspensão de esporos na concentração de 50.000 esporos.mL⁻¹. As placas foram acondicionadas em câmara B.O.D. Nas primeiras 10 horas os discos foram mantidos no escuro a temperatura constante de 22°C. Posteriormente, o programa foi de 14 h de luz e temperatura constante de 25°C. Após 15 h, foi retirada a gotícula de cada disco, e deixada por sete dias na B.O.D. para avaliação da esporulação do míldio.

A avaliação foi realizada com base na contagem de esporangióforos formados por disco foliar e mediante valores categóricos baseados na indexagem visual (1 a 9), adaptada de (BELLIN *et al.*, 2009 e BLASI *et al.*, 2011), onde: 1 = Esporulação abundante cobrindo densamente a área do disco e ausência de necrose; 3 = Esporulação densa com grandes manchas predominantes e ausência de necrose; 5 = Esporulação limitada presente em manchas esparsas ou misturadas com áreas assintomáticas. Manchas necróticas debaixo de áreas esporulação; 7 = Pequenas manchas necróticas com esporangióforos esparsos e 9 = Ausência de esporulação e manchas necróticas ou necrose subestomática.

4.3.2. Avaliação para o oídio

Uma replica das plantas foi estabelecida em casa-de-vegetação na EPAGRI (Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina) em Videira, para as avaliações de suscetibilidade ao oídio. Serão avaliadas no ciclo 2014 – 2015 por outros integrantes do projeto.

4.4. Análise estatística

Para as análise de dados genéticos foram realizadas distribuições de frequências e o teste de χ^2 para a análise de segregação dos alelos de resistência. Intervalos de confiança (IC) a 95% foram utilizados para a comparação de médias das avaliações fenotípicas do míldio. Para as análises, foi empregado o programa estatístico R (R Development Core Team, 2013).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Desenvolvimento de PCR multiplex para SAM

Foram realizadas extrações de DNA de 420 plantas da população UFSC-2013-1 e 217 plantas da população UFSC-2013-2, com o kit de extração NucleoSpin[®] Plant II. A quantificação do DNA das plantas, realizada no espectrofotômetro NanoDrop 1000, revelou-se razão de absorbância da relação 260/230 menor de 1,70, significando que as amostras estavam livres de contaminantes, como as proteínas e ligeiramente contaminadas por polifenóis. É muito importante ter amostras de boa qualidade, porque isto permitirá realizar um trabalho sem contratempos no momento da genotipagem por perda de corridas, além de reduzir o gasto desnecessário de reagentes, permitindo obter resultados satisfatórios no menor tempo possível. As amostras apresentavam em torno de 10 a 50 ng/μl de DNA e foram diluídas para uma concentração de 1 ng/μl e armazenadas em freezer a -20°C para as análises posteriores.

Pensando em economizar tempo e esforço nos trabalhos genéticos em videira, vários pesquisadores tem procurado realizar múltiplas reações de PCR em um mesmo tubo (multiplex). Segundo Merdinoglu *et al.* (2005), apesar das inúmeras vantagens do uso de microssatélites como marcadores genéticos, tem limitação por causa do baixo número de locos que podem ser analisados simultaneamente por corrida. Estes autores para aumentar a informação por SSR em ensaios da videira desenvolveram um amplo conjunto de novos marcadores adequados para reações multiplex e multi-carregamento. Ibáñez *et al.* (2009) estudando relações genéticas entre variedades de uvas de mesa, fizeram uma genotipagem de 376 acessos com 25 marcadores microssatélites utilizando três PCRs multiplex. Assim também, Moreno-Sanz *et al.* (2011) avaliaram um total de 293 acessos de videira com nove marcadores microssatélites em duas reações multiplex de PCR. Segundo Merdinoglu *et al.* (2005), em comparação com o procedimento convencional simples, a reações multiplex reduz os custos dos reagentes PCR por cerca de 50% e os custos relacionados aos reagentes da eletroforese por mais de 85%.

No trabalho de Ibáñez *et al.* (2009) foi verificado que as concentrações de iniciadores equimolares destas PCRs multiplex apresentaram amplificação desigual, com alguns dos produtos escassamente amplificados. Para obter amplificações similares de cada

marcador os autores diminuíram a quantidade de iniciadores fortemente amplificados, aumentando a quantidade de iniciadores escassamente amplificados, desta maneira ajustando as concentrações dos reagentes restantes para a PCR em conformidade. Para Schori *et al.* (2013) o problema da baixa eficiência da PCR pode ser resolvido em nível da polimerase. Kapa Biosystems (Woburn, Massachusetts, USA) desenvolveu recentemente uma enzima com tolerância específica para os inibidores comuns de plantas. "KAPA2G" e "KAPA3G" são enzimas de segunda geração obtidas a partir através da engenharia molecular, permitem sintetizar mais rapidamente o DNA e são mais eficientes na presença de inibidores.

Para a realização das reações multiplex é muito importante que os iniciadores que vão ser usados estejam funcionando e tenham a mesma temperatura de anelamento. Os iniciadores utilizados foram testados separadamente com uma *Taq polimerase* comum, para confirmar seu funcionamento em base à produção de fragmentos, que foi visualizada no gel de agarose 1,5%. Utilizando o kit KAPA 2G (Kapa Biosystems, Inc. Boston, USA), foram realizados testes de reações multiplex com poucas amostras para verificar as amplificações dos iniciadores na mesma reação (Figura 2).

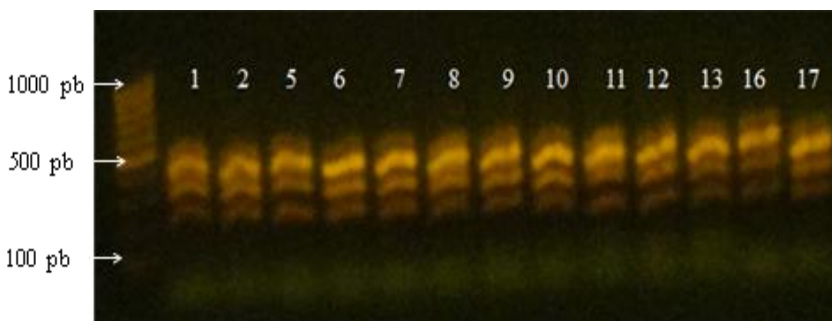


Figura 2. Resultado da amplificação mediada por seis pares de iniciadores em uma reação de PCR multiplex, resolvida em gel de agarose a 1,5%. Cada banda representa uma reação independente. Na primeira coluna da esquerda o marcador molecular de 100 pb (Ladder). As seguintes colunas representam plantas com produtos da PCR amplificados pelos marcadores microsatélites.

Deve-se considerar que os iniciadores que tenham tamanhos parecidos têm que ser marcados com fluorescências diferentes, para ao momento da interpretação dos dados não existam confusões. Neste trabalho, três marcadores *forward* foram marcados com a fluorescência FAM, dois com VIC e um com PET. Os melhores picos resultaram com

as fluorescências 6-FAM e VIC; já com a fluorescência PET os picos foram em qualidade um pouco inferiores.

As primeiras PCR foram feitas em volume final de 10 µl, onde foram usados 5 µl no gel de agarose para confirmar a amplificação das reações e o excedente usado na genotipagem. Uma vez que a metodologia foi ajustada, não houve a necessidade de confirmar as amplificações, o que permitiu realizar reações com volume final de 5 µl. Após a otimização da reações de PCR foram feitos os primeiros testes de genotipagem no Applied Biosystems 3500 XL. O excesso de produto de PCR nas corridas impossibilitava a genotipagem, já que satura os picos do marcador LIZ 600. Nesta segunda fase, houve a necessidade de identificar a quantidade exata de água para a diluição dos produtos da PCR. No presente estudo, as corridas funcionaram com a diluição de 1 µl do produto da PCR em 27 µl da água. Desta maneira, a otimização das reações teve como consequência a redução de tempo e dos custos dos reagentes.

A aparição dos picos de cada um dos iniciadores se deu quando todos os ajustes foram feitos. Posteriormente, foram realizadas 10 reações de PCR e oito corridas com 4 injeções na eletroforese capilar no Applied Biosystems 3500 XL, resultando em sucesso as reações multiplex de todos os marcadores SSR utilizados na genotipagem (Figura 3). Atualmente, o desenvolvimento de novas DNA polimerases, com maior tolerância para os inibidores de PCR de plantas e melhor capacidade para amplificar fragmento de DNA, permite uma genotipagem mais efetiva e eficiente. Com o uso destas novas alternativas Migliaro *et al.* (2012) fizeram uma genotipagem com 11 locos SSR numa só reação de PCR multiplex, utilizando amostras brutas. Estes autores concluíram que esta técnica é uma ferramenta útil para acelerar a genotipagem de videira, melhorando a aplicação prática dos resultados da pesquisa. No presente trabalho também foi demonstrado que reações multiplex de PCR são possíveis na seleção assistida por marcadores moleculares e permitiu acelerar o trabalho com maior eficiência e menor custo.

Estas estratégias moleculares têm influenciado o melhoramento convencional das culturas, em especial o da videira. No passado a estratégia de melhoramento era mais demorada porque não existiam ferramentas moleculares aplicáveis para a obtenção de resultados satisfatórios em um tempo menor. O desenvolvimento e posterior uso de iniciadores flanqueadores a locos com genes de resistência são um grande avanço na seleção e piramidação de alelos de interesse, além de permitirem identificar as plantas que sofreram recombinação na posição

do gene estudado. Marcadores microssatélites têm sido utilizados para identificar características de interesse, devido a que são específicos, de herança mendeliana e codominantes, permitindo identificar os locos das plantas em estado homozigoto ou heterozigoto. O avanço tecnológico também permite realizar PCR multiplex, reduzindo o tempo na obtenção dos resultados, sendo estes precisos e claros. Com estas técnicas os melhoristas garantem uma herdabilidade aproximada a 1 e terão segurança das características que possuem suas linhas de melhoramento, uma vez que a seleção passa a ser baseada no genótipo.

5.2. Seleção assistida por marcadores moleculares para locos de resistência ao míldio (*Plasmopara viticola*) em videira

5.2.1. Avaliação genética

A genotipagem com os quatro marcadores microssatélites ligados aos locos de resistência *Rpv1* e *Rpv3* (dois marcadores flanqueando cada um dos locos) permitiu classificar as plantas conforme os alelos de resistência que apresentam. As plantas foram consideradas como tendo os locos de resistência quando os dois marcadores microssatélites para cada loco apresentavam os alelos originalmente ligados aos alelos de resistência. No total, 637 plantas foram genotipadas, sendo que destas, 15 apresentaram recombinação genética entre pelo menos um dos pares de marcadores microssatélites utilizados na SAM e, portanto, foram desconsideradas da análise.

Para as 622 plantas restantes, 10 plantas (1,6%) exibiram os dois alelos em homozigose (*Rpv1/Rpv1*, *Rpv3/Rpv3*)¹, 11 plantas (1,8%) registram o alelo *Rpv1* em homozigose (*Rpv1/Rpv1*, *rpv3/rpv3*)², 13 plantas (2,1%) carregam o alelo *Rpv1* em homozigose e *Rpv3* em heterozigose (*Rpv1/Rpv1*, *Rpv3/rpv3*), 97 plantas (15,6%) apresentam o alelo *Rpv1* em heterozigose e *Rpv3* em homozigose (*Rpv1/rpv1*, *Rpv3/Rpv3*), 180 plantas (28,9%) tem os dois alelos em heterozigose (*Rpv1/rpv1*, *Rpv3/rpv3*), 81 plantas (13,0%) apresentam apenas o alelo *Rpv1* em heterozigose (*Rpv1/rpv1*, *rpv3/rpv3*), 116 plantas (18,6%) registram o alelo *Rpv3* em heterozigose (*rpv1/rpv1*, *Rpv3/rpv3*), 78 plantas (12,5%) tem o alelo *Rpv3* em homozigose (*rpv1/rpv1*, *Rpv3/Rpv3*) e 36 plantas (5,8%) apresentaram ausência dos alelos de resistência (*rpv1/rpv1*, *rpv3/rpv3*) (Figura 4A).

¹ Primeira letra maiúscula indica alelo dominante.

² Primeira letra minúscula indica alelo recessivo.

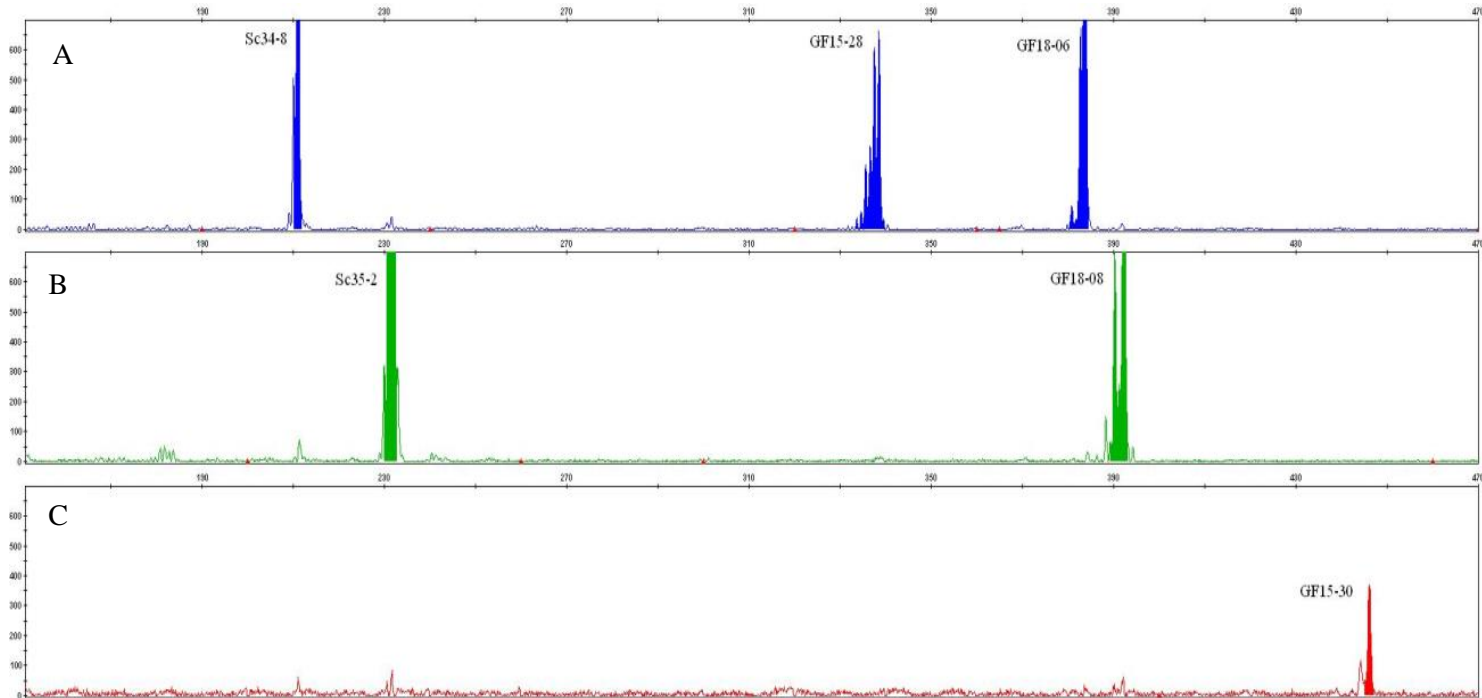


Figura 3. Eletroferograma de uma reação multiplex de PCR com marcadores microssatélites na genotipagem da planta 213, homozigota para todos os alelos de resistência. A: marcadores com a fluorescência 6-FAM [(Sc34_8 (211pb); GF15-28 (339pb); GF18-06 (384pb)], B: marcadores com a fluorescência VIC [(Sc35_2 (232pb); GF18-08 (392pb)], e C: marcador GF15-30 (446pb) com fluorescência PET. Plataforma de sequencia utilizada Aplidd Byosistem 3500 XL.

Comparando-se a genotipagem entre as duas populações, observou-se proporções similares nos genótipos *Rpv1/Rpv1*, *Rpv3/rpv3*; *Rpv1/rpv1*, *Rpv3/Rpv3*; *Rpv1/rpv1*, *Rpv3/rpv3* e *rpv1/rpv1*, *Rpv3/rpv3*, enquanto que, nos demais genótipos as frequências foram distintas (Figura 4B).

Considerando apenas a presença dos locos de resistência, não levando em consideração se estão em homozigose ou heterozigose, 36 plantas (5,8%) não apresentaram nenhum dos locos de resistência, 92 plantas (14,8%) apresentam apenas *Rpv1*, 194 plantas (31,2%) carregam apenas *Rpv3* e 300 plantas (48,2%) apresentam os dois locos de resistência piramidados.

A análise da segregação dos locos individualmente revelou claramente uma distorção na segregação em relação às proporções Mendelianas esperadas, principalmente para os marcadores *Sc34_8* e *Sc35_2*, usados para a seleção de plantas carregando *Rpv1* (Tabela 1). Na população UFSC-2013-1, ambos marcadores segregaram numa proporção de 23 homozigotos (*Rpv1/Rpv1*), 229 heterozigotos (*Rpv1/rpv1*) e 161 homozigotos (*rpv1/rpv1*) [$\chi^2 = 97,12$ ($P=2,2e-16$)]. Caso similar é apresentado na população UFSC-2013-2, onde foram verificados 11 homozigotos (*Rpv1/Rpv1*), 129 heterozigotos (*Rpv1/rpv1*) e 69 homozigotos (*rpv1/rpv1*) [$\chi^2 = 43,68$ ($P=3,274e-10$)]. Nas duas populações estudadas, foi observado um excesso de heterozigotos e homozigotos sensíveis ao míldio para o loco de resistência *Rpv1* e um déficit de homozigotos para o loco de resistência.

No caso dos marcadores GF18-06 e GF18-08, ligados ao loco de resistência *Rpv3*, a segregação resultou ser Mendeliana em uma e mais distorcida na outra população. Na população UFSC-2013-1, ambos marcadores segregaram na proporção de 132 homozigotos (*Rpv3/Rpv3*), 205 heterozigotos (*Rpv3/rpv3*) e 76 homozigotos (*rpv3/rpv3*) [$\chi^2 = 15,20$ ($P=0,0005$)], portanto, distorcida. A segregação Mendeliana ocorreu na população UFSC-2013-2 onde se registraram de 53 homozigotos (*Rpv3/Rpv3*), 104 heterozigotos (*Rpv3/rpv3*) e 52 homozigotos (*rpv3/rpv3*) [$\chi^2 = 0,014$ ($P=0,99$)]. Os desvios significativos no valor de χ^2 na primeira população foram em parte influenciados pela morte de 51 plantas sensíveis. No caso da segunda população, as proporções observadas estão de acordo com as esperadas (Tabela 1).

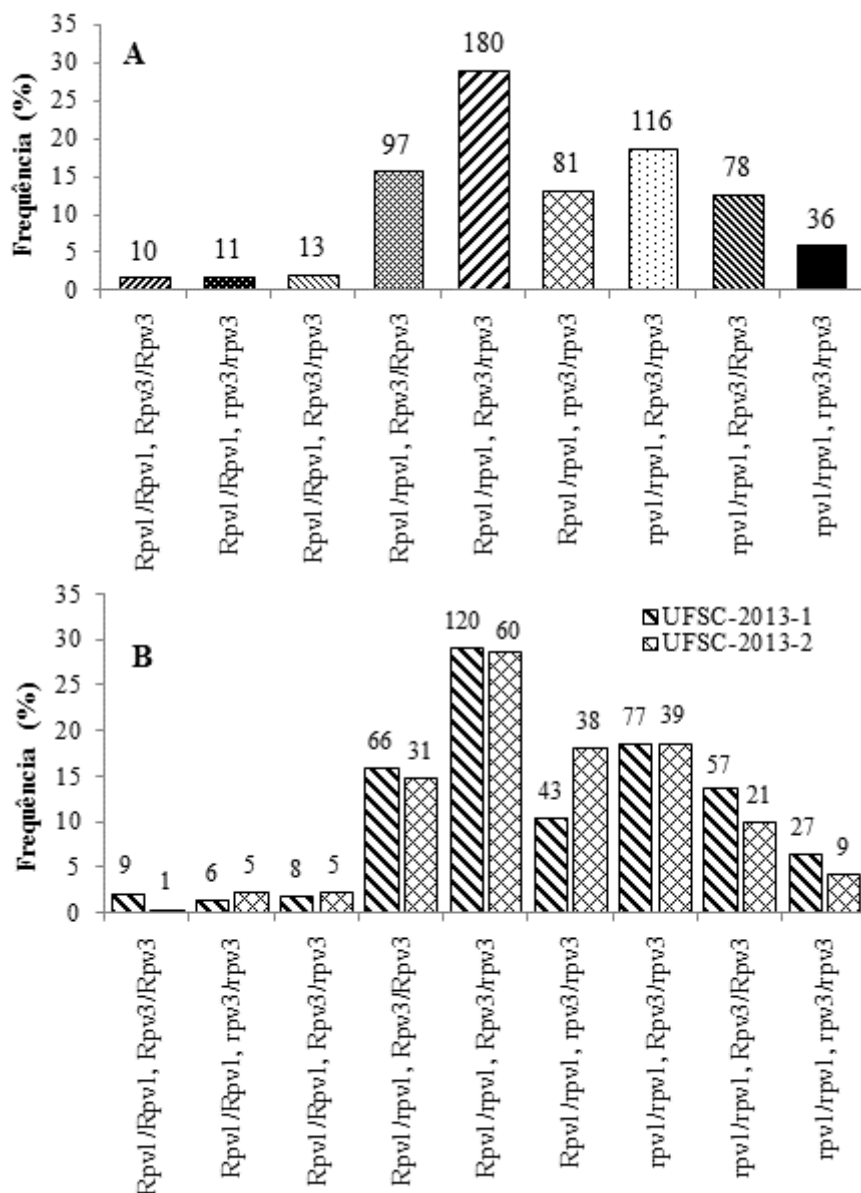


Figura 4. Distribuição de frequência em percentagem de nove genótipos com locos relacionados com a resistência ao míldio em 622 plantas provenientes das populações experimentais UFSC-2013-1 e UFSC-2013-2. A: plantas totais, B: plantas divididas por população.

Tabela 1. Proporções obtidas e teste de qui-quadrado para marcadores que ancoram locos de resistência ao míldio em duas populações segregantes de videira obtidas por autofecundação da F₁.

Populações	Número de plantas	Marcadores: Sc34_8/Sc35_2			χ^2 (1:2:1)	Marcadores: GF18-06 / GF18-08			χ^2 (1:2:1)
		<i>Rpv1/Rpv1</i>	<i>Rpv1/rpv1</i>	<i>rpv1/rpv1</i>		<i>Rpv3/Rpv3</i>	<i>Rpv3/rpv3</i>	<i>rpv3/rpv3</i>	
UFSC-2013-1	413	23	229	161	97,12 $P= 2,2\text{e-}16$	132	205	76	15,20 $P= 0,0005$
UFSC-2013-2	209	11	129	69	43,68 $P= 3,3\text{e-}10$	53	104	52	0,014 $P= 0,99$

Como as duas populações experimentais avaliadas foram obtidas pela autofecundação, era esperado um aumento do número de homozigotos pelo efeito da endogamia. Porém, é muito provável que o desvio na segregação tenha provocado um aumento dos homozigotos sensíveis, o que dificultou desenvolver um maior número de linhas homozigotas com os locos de resistência.

Segundo Harushima *et al.*, (1996) o desvio das proporções Mendelianas esperadas tem sido frequentemente observado nos descendentes de híbridos intra e inter-específicos. Para Lyttle (1991) a distorção de segregação são exemplos de competição de gametas, compreendendo um grupo de sistemas de acionamento gênico encontrada numa grande variedade de organismos, geralmente envolvendo um pequeno número de interação de locos primários. Seguindo este principio a distorção nas populações estudadas poderia ter sido provocado por algum fator esporofítico nos parentais.

Bouquet 1986, citado por Pauquet *et al.* (2001), no cruzamento entre *M. rotundifolia* G52 x Malaga seedling No.1, a fim de introduzir resistência ao oídio e ao míldio, observaram que as taxas de segregação foram muito distorcidas, devido ao desequilíbrio dos cromossomos e a mortalidade das plantas, para deduzir o determinismo genético da resistência. Pauquet *et al.* (2001) estudando populações do 4^o e 5^o retrocruzamento provenientes deste mesmo cruzamento (*M. rotundifolia* G52 x Malaga seedling No.1) com outras *V. vinifera* encontraram duas populações que apresentaram uma proporção de segregação distorcida, com um excesso de genótipos susceptíveis, podendo ser devido à influência do *background* genético de onde o gene foi introduzido. As comparações de dados de mapeamento físicos e genéticos indicam que a recombinação é severamente reprimida nas imediações do *Run1* (cromossomo 12), possivelmente devido à sequência divergente contida no fragmento introduzido de *M. rotundifolia*, que transporta os locos *Rpv1/Run1* (BACKER *et al.*, 2005).

Segundo Riaz *et al.* (2008) na população 04190 proveniente de *V. vinifera* x *V. arizonica/candicans*, a distorção no cromossomo 14 foi devido a um maior número esperado de homozigotos, implicando o envolvimento de fatores masculinos de seleção gametofítica nesta região do cromossomo. Concordando com Lu *et al.* (2002) que, avaliando regiões cromossômicas associadas com distorção de segregação do milho, encontraram excesso de um dos genótipos homozigotos, em 50 dos 55 locos (91%) estudados, considerando que a distorção de segregação é consistente com os efeitos de

fatores de gametofíticos, o que provoca o excesso de um e deficiência do outro homozigoto, mas a frequência de heterozigotos permanece constante a 0,50.

Assim também Harushima *et al.* (1996) com o cruzamento de arroz 'Kasalath' (*var. indica*) x 'Nipponbare' (*var. japonica*) encontraram a distorção mais pronunciada na região intermediária do cromossomo 3, com 3,2% do genótipo homozigoto em 'Nipponbare', 49,5% em 'Kasalath', e de 47,3% no heterozigoto. No caso extremo, Matsubara *et al.* (2011) avaliando 332 acessos encontraram somente um homozigoto para o alelo KSH do loco *RM1371* na população de arroz QZZ, indicando transmissão quase que exclusiva do alelo por qualquer gameta masculino ou o feminino. Kumar *et al.* (2007) mencionam que na população de trigo IsAm, sete marcadores desviaram significativamente ($P < 0,05$) da razão esperada de 1:1, distorção devido ao maior número de heterozigotos e menor número de genótipos homozigotos do que o esperado.

Em populações de Citrus as distorções de segregação também foram observadas no nível zigótico com a menor frequência observada de homozigotos do que o esperado, nos grupos de ligação 5 e 7. Uma vez que ambas as classes de homozigotos são reduzidas em número de indivíduos, duas explicações possíveis são sugeridas: a presença de fatores recessivos letais ou a presença de genes de incompatibilidade de gametas nessas regiões genômicas. Estes fatores, que favorecem a heterozigosidade, poderiam explicar, pelo menos em parte, à elevada heterozigosidade encontrado dentro da subfamília laranja (RUIZ e ASINS, 2003).

5.2.2. Avaliação fenotípica

A técnica de inoculação por discos foliares é amplamente utilizada nos estudos de resistência genética a *P. viticola* em videira e tem sido muito eficaz na diferenciação fenotípica entre plantas resistentes e susceptíveis (BOSO *et al.*, 2006; BOSO e KASSEMAYER, 2008; BELLIN *et al.*, 2009; CASAGRANDE *et al.*, 2011; SCHWANDER *et al.*, 2012; VENUTI *et al.*, 2013). Na avaliação da confiabilidade de bioensaios foliares para a previsão de resistência a doenças no fruto da videira Calonnec *et al.* (2012) demonstraram que o uso dos primeiros bioensaios em folhas, garante um nível satisfatório de resistência ao míldio, dos cachos no campo.

Um quarto do total de plantas genotipadas foi testado fenotipicamente, sendo representada cada uma das nove combinações alélicas obtidas em um número proporcional de plantas. Nas avaliações

fenotípicas, a variável número de esporangióforos formados por disco foliar e valores categóricos baseados na indexagem visual apresentaram uma correlação de Pearson altamente significativa ($r = -0.84^{**}$). Este resultado era de certa forma esperado, pois indica que quando diminui o número de esporangioforos no disco, aumenta o número na escala.

Na Figura 5 são apresentados os valores médios do número de esporangióforos por disco foliar. Observa-se a formação de três grupos, onde a maior incidência do míldio foi observada nas plantas com ausência dos alelos de resistência (*rpv1/rpv1*, *rpv3/rpv3*) (Grupo 1). O segundo grupo é formado pelas plantas com apenas um dos locos de resistência, não importando se os alelos encontram-se em homozigose ou heterozigose (*Rpv1/rpv1*, *rpv3/rpv3*; *Rpv1/Rpv1*, *rpv3/rpv3*; *rpv1/rpv1*, *Rpv3/rpv3* e *rpv1/rpv1*, *Rpv3/Rpv3*) em cujas plantas ocorreu uma incidência intermediária. O terceiro grupo é composto pelas plantas que apresentam os dois alelos de resistência piramidados (*Rpv1/rpv1*, *Rpv3/rpv3*; *Rpv1/Rpv1*, *Rpv3/rpv3*; *Rpv1/rpv1*, *Rpv3/Rpv3* e *Rpv1/Rpv1*, *Rpv3/Rpv3*). O menor valor médio de esporangióforos/disco foi observado nas plantas contendo os dois alelos de resistência em homozigose (4,9).

Estes resultados indicam que a interação alélica nos dois locos de resistência é de dominância do alelo de resistência e que os dois locos apresentam efeito aditivo sobre a resistência ao míldio da videira.

A melhor combinação dos locos *Rpv1* e *Rpv3* em homozigose apresentaram o melhor controle da doença. Um resultado similar foi registrado na piramidação de genes de resistência à ferrugem-asiática da soja. Os genes de resistência *Rpp2* e *Rpp3* em homozigose resultaram no aumento da resistência à doença (MAPHOSA *et al.*, 2012).

Nas reações às inoculações observou-se que plantas do mesmo genótipo apresentaram variabilidade na resposta ao patógeno. Esta variação pode ser devida parcialmente à metodologia empregada e em parte estar sendo influenciada pelos diferentes *background* genéticos em que se encontram os locos contendo os alelos de resistência. É possível que alguns QTLs de menor efeito, ou mesmo outras sequências codantes, estejam segregando nas populações estudadas e que também participam da reação da planta ao patógeno. Desta forma, distintos genótipos com os mesmos alelos de resistência a uma doença, podem apresentar graus distintos de resistência, como ocorreu no presente trabalho, o que é ilustrado pelo intervalo de confiança da média da resistência de cada genótipo estudado.

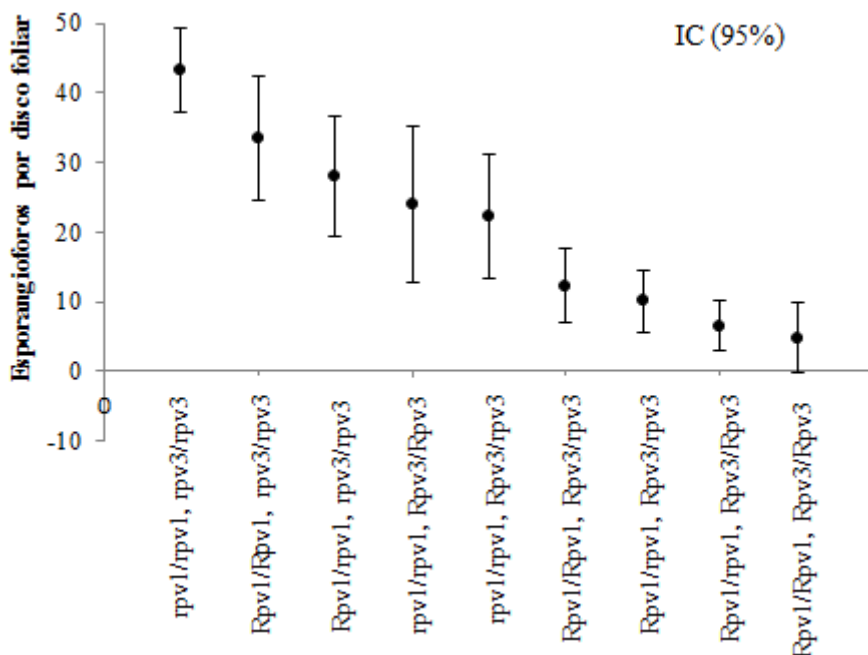


Figura 5. Valores médios do número de esporangióforos por disco foliar com intervalos de confiança a 95% de nove combinações genótípicas dos locos *Rpv1* e *Rpv3*. Nas plantas com o genótipo rpv1/rpv1, rpv3/rpv3 foram contados os números de esporangióforos até 50. Assim, plantas com maior número de esporangióforos foram incluídas nesta mesma classe.

O desenvolvimento de linhas de melhoramento para a resistência genética ao míldio e ao oídio é demorado e leva muitos anos de trabalho. Graças ao esforço de muitos pesquisadores no melhoramento genético da videira foram desenvolvidos parentais com características de interesse relacionado ao controle destas moléstias. Isto permite realizar a pirâmidação de genes de resistência, como constatado neste estudo.

A obtenção de plantas com os locos de resistência *Rpv1* e *Rpv3* em homozigose é uma grande contribuição para os melhoristas, porque estas plantas ao serem cruzadas com outras variedades de interesse econômico garante que as plantas F_1 terão os genes de resistência em heterozigose no seu *background* genético, cuja combinação fará que as plantas sejam mais tolerantes as doenças. Proporciona também um

avanço nos programas de melhoramento vegetal, devido à redução de tempo na obtenção de variedades resistentes.

Este padrão dos efeitos combinatórios de genes de resistência tem sido observado em vários trabalhos de piramidação. Min *et al.* (2012) na piramidação de genes de resistência para helmintosporiose comum (*Exserohilum turcicum*) e carvão do pendão (*Sphacelotheca reiliana*) em milho, encontraram que linhas carregando os genes Ht1, Ht2 e QTL para *S. reiliana*, tiveram um maior nível de resistência e rendimento em comparação com os parentais Ent17 e Ent12, e as linhas carregando as combinações Ht1 e Ht2, Ht1 QTL para *S. reiliana*, respectivamente.

Em arroz, Huang *et al.* (1997) visando a piramidação de quatro genes de resistência, xa-4, xa-5, xa-13 e xa-21, contra a bactéria *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*, mediante a SAM, obtiveram linhagens com dois, três e quatro genes de resistência piramidados. As linhas obtidas foram testadas mostrando um espectro mais amplo e um maior nível de resistência do que as linhas com apenas um único gene. Similarmente, Sing *et al.* (2001) avaliando a combinação dos genes de resistência xa-5, xa-13 e xa-21, concluíram que estes genes em combinação têm um espectro mais largo de resistência ao agente patogênico predominante na população da região, sendo mais efetivos que quando isolados.

Os resultados do presente trabalho também sugerem que com a presença de um alelo só, seja Rpv1 ou Rpv3, estando o loco em heterozigose, proporciona uma ligeira vantagem no controle da doença em comparação a presença do mesmo alelo em homozigose (Figura 5). É possível que as plantas em heterozigose tenham interação com alelos favoráveis de outros genes, que tornam a planta mais tolerante ao míldio.

A vantagem do heterozigoto é um tema estudado há varias décadas. Greenberg e Crow (1960) encontraram que indivíduos de *Drosophila* que carregavam seus alelos em homozigose eram menos viáveis em comparação aos heterozigotos (exogâmicos). Observaram, os autores, mutações letais nos homozigotos recessivos e os homozigotos livres de mutações letais foram menos adaptados em comparação aos heterozigotos (exogâmicos). Este fenômeno, chamado depressão endogâmica, poderia ser definido como redução na aptidão média devido ao aumento da homozigose. A depressão endogâmica implica que a aptidão do heterozigoto é, em média, mais próxima ao do homozigoto mais apto.

Assim, Brunelli *et al.* (2002) na identificação de marcadores microssatélites ligados a genes de resistência a *Puccinia polysora* em milho, encontraram o que marcador Phi65 mostrou-se significativamente associado ($P < 0,000032$) à redução no número de lesões. Neste caso, o número de lesões para indivíduos homozigotos do genitor resistente foi de 63 e quando o genótipo foi heterozigoto, o número médio de lesões foi de 83, valores que não diferiram estatisticamente entre si.

Na avaliação do nível de resistência ao míldio nos valores categóricos baseados na indexagem visual, não foram observadas infecções em 47,2% das plantas avaliadas. A classe 1 foi majoritariamente representada por plantas que não carregavam nenhum dos alelos de resistência (76,5%) e por plantas com o alelo Rpv1 (23,5%). Na classe 3 encontrou-se 25% de plantas com ausência dos locos de resistência, 25% com o alelo Rpv1, e o outro 50% correspondeu para plantas com o alelo Rpv3. Na classe 5 foram enquadradas as plantas com Rpv1 (55%), Rpv3 (30%) e com os dois alelos combinados (15%). A classe 7 foi representada principalmente por plantas com alelos de resistência nos dois locos (64,7%), seguido das plantas com Rpv1 e Rpv3 (20,6 e 14,7%, respectivamente). Na classe 9, 83,6% foi representado pelas plantas com alelos de resistência nos dois locos (*Rpv1* e *Rpv3*) e 16,4% por plantas com o alelo Rpv3. As plantas contendo os dois locos de resistência em homozigose foram enquadradas nas classes 7 e 9 (Figura 6).

Os genótipos com os alelos combinados (*Rpv1/rpv1*, *Rpv3/rpv3*; *Rpv1/Rpv1*, *Rpv3/rpv3*; *Rpv1/rpv1*, *Rpv3/Rpv3* e *Rpv1/Rpv1*, *Rpv3/Rpv3*) demonstraram melhor comportamento no controle da doença em comparação às plantas com um ou nenhum alelo de resistência nos dois locos. Desta maneira, é notável que o aumento dos alelos de resistência diminuísse o ataque da *P. viticola*.

Os resultados do presente trabalho concordam com os dados obtidos por Eibach *et al.* (2007), que avaliando o grau de infecção do míldio mediante uma escala nominal, encontraram que os genótipos que possuem *Rpv1* apresentam uma distribuição de frequência deslocada para as classes mais baixas de infecção em comparação com os indivíduos sem *Rpv1*. Assim também, Schwander *et al.* (2012) mencionam que quando ambos alelos Rpv3 e Rpv10 relacionados com a resistência estão ausentes, há uma clara mudança no sentido de uma maior frequência de indivíduos com alta suscetibilidade. Ao contrário, segundo os referidos autores, a presença dos alelos de resistência combinados levou a uma mudança para as classes com um maior nível

de resistência ao míldio ou distribuição intermediária quando apenas um dos alelos relacionados à resistência estava presente.

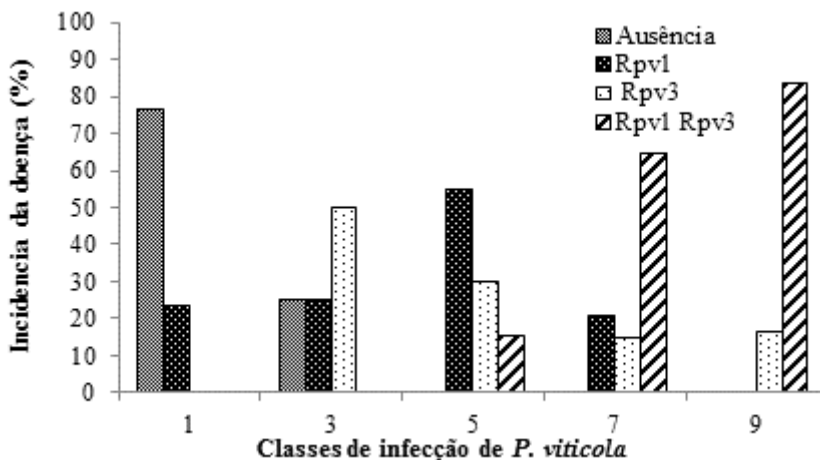


Figura 6. Distribuição de frequência (%) para classes de infecção de *P. viticola* em uma população de 142 plantas provenientes das populações experimentais UFSC-2013-1 e UFSC-2013-2. (1: Abundante esporulação; 9: Ausência de esporulação).

Os resultados das avaliações fenotípicas mostraram que os genótipos que carregam alelos Rpv3 são mais resistentes ao controle da doença em comparação aos que carregam alelos Rpv1 (Figuras 5 e 6). Estes dois locos contribuem para um significativo controle da doença, e tem sido estudados em vários ensaios em laboratório e a campo, mostrando efeitos significativos nos níveis de infecção do oomiceto (*Rpv1* - EIBACH *et al.*, 2007; CALONNEC *et al.*, 2012 e *Rpv3* - BELLIN *et al.*, 2009; CASAGRANDE *et al.*, 2011; SCHWANDER *et al.*, 2012; VENUTI *et al.*, 2013).

O efeito maior dos genes de resistência é muito comum. Venuti *et al.* (2013) observaram que o tipo e o tempo da reação das plantas que carregam o alelo Rpv12 são semelhantes aos desencadeada por Rpv3, porém a limitação imposta à esporulação do patógeno é mais significativa. Este efeito também foi observado por Calon nec *et al.* (2012) em avaliações do oídio, nas quais os genótipos com ambos os genes de resistência (Run1 e QTLRgP) não foram significativamente diferentes dos que só carregavam Run1.

O efeito dos alelos no grau de resistência é demonstrado na Figura 7. Observa-se que quando as plantas carregam somente um dos

alelos de resistência, indiferentemente em homozigose ou heterozigose, o controle da doença é menor ou igual a 45%. Entretanto, quando as plantas carregam a combinação dos alelos de resistência nos dois locos alcançaram um controle de 76,8% a 88,9% das infecções por *P. viticola*.

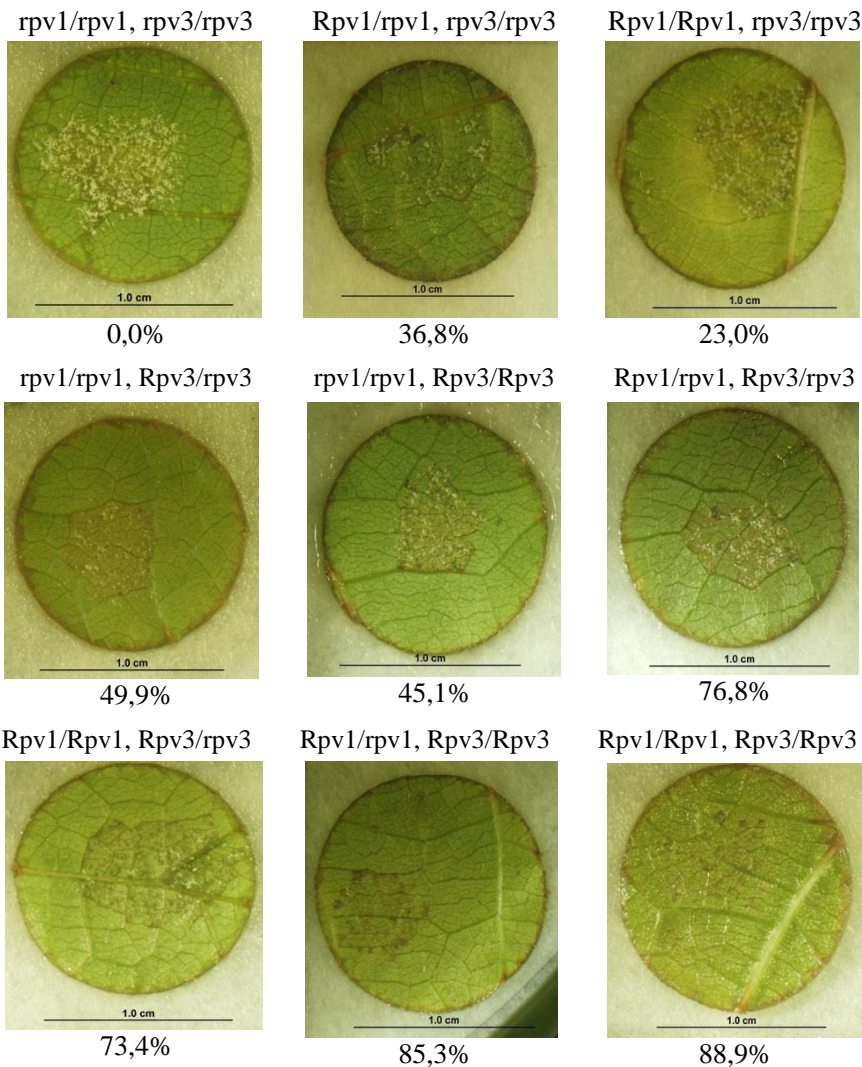


Figura 7. Percentagem do grau de resistência, avaliada com base no número de esporangióforos por disco foliar.

Estes resultados indicam que a combinação de alelos nos dois locos de resistência *Rpv1* e *Rpv3* tem um efeito positivo nas plantas de videira fazendo-as mais resistente à doença. Também concordam estes resultados com aqueles encontrados por Eibach *et al.* (2007), demonstrando que a combinação de ambos os genes resultou no efeito aditivo no grau de resistência à doença. Assim também, Schwander *et al.* (2012) observaram um efeito aditivo sobre o nível de resistência do mildio por combinação dos locos de resistência *Rpv3* e *Rpv10*, indicando que são aplicáveis para a piramidação de resistência via MAS. Venuti *et al.* (2013) efetuando a introgressão de genes de resistência de *V. amurensis* para *V. vinifera*, encontraram que a combinação dos alelos de resistência *Rpv3* e *Rpv12* em heterozigose dificultaram o crescimento de *P. viticola* em comparação com as plantas que carregavam apenas um ou nenhum dos alelos de resistência.

5.3. Seleção assistida por marcadores moleculares para locos de resistência ao oídio (*Erysiphe necator*) em videira

A genotipagem com os quatro marcadores microssatélites ligados aos locos de resistência *Run1* e *Ren3* (dois marcadores flanqueando cada um dos locos) permitiu classificar as plantas conforme os alelos de resistência que estas apresentam. As plantas foram consideradas como positivas para a resistência, quando os dois marcadores microssatélites apresentavam os alelos originalmente ligados aos locos de resistência. Nas duas populações foram genotipadas 637 plantas, onde 21 apresentaram recombinação entre pelo menos um dos marcadores microssatélites e foram desconsiderados da análise.

Para as 616 plantas restantes, sete plantas (1,1%) exibiram os dois alelos em homozigose (*Run1/Run1*, *Ren3/Ren3*)¹, nove plantas (1,5%) registraram o alelo *Run1* em homozigose (*Run1/Run1*, *ren3/ren3*)², 16 plantas (2,6%) carregaram o alelo *Run1* em homozigose e *Ren3* em heterozigose (*Run1/Run1*, *Ren3/ren3*), 103 plantas (16,7%) apresentaram o alelo *Run1* em heterozigose e *Ren3* em homozigose (*Run1/run1*, *Ren3/Ren3*), 185 plantas (30%) registraram os dois alelos de resistência em heterozigose (*Run1/run1*, *Ren3/ren3*), 68 plantas (11,0%) apresentaram apenas o alelo *Run1* em heterozigose (*Run1/run1*, *ren3/ren3*), 125 plantas (20,3%) registraram o alelo *Ren3* em heterozigose (*run1/run1*, *Ren3/ren3*), 64 plantas (10,4%) registraram o

¹ Primeira letra maiúscula indica alelo dominante

² Primeira letra minúscula indica alelo recessivo

alelo *Ren3* em homozigose (*run1/run1*, *Ren3/Ren3*) e 39 plantas (6,3%) apresentaram ausência dos alelos de resistência (*run1/run1*, *ren3/ren3*) (Figura 8A). O maior número de plantas foi registrado com as combinações *Run1/run1*, *Ren3/Ren3*; *Run1/run1*, *Ren3/ren3* e *run1/run1*, *Ren3/ren3* (Figura 8B).

Considerando apenas a presença dos locos de resistência, não levando em consideração se estão em homozigose ou heterozigose, 39 plantas (6,3%) não apresentaram nenhum dos alelos de resistência nos dois locos, 77 plantas (12,5%) apresentaram apenas *Run1*, 189 plantas (30,7%) carregavam apenas *Ren3* e 311 plantas (50,5%) apresentaram os dois locos de resistência piramidados.

A análise individual dos locos demonstra claramente uma distorção de segregação, principalmente para os marcadores *Sc34_8* e *Sc35_2*, usados para a seleção de plantas carregando o alelo *Run1*. Na população UFSC-2013-1 ambos marcadores segregaram na proporção de 21 homozigotos (*Run1/Run1*), 227 heterozigotos (*Run1/run1*) e 159 homozigotos (*run1/run1*) [$\chi^2 = 99,01$ ($P = 2,2e-16$)]. Resultado similar foi revelado na população UFSC-2013-2, onde foram registrados 11 homozigotos (*Run1/Run1*), 129 heterozigotos (*Run1/run1*) e 69 homozigotos (*run1/run1*) [$\chi^2 = 43,68$ ($P = 3,274e-10$)] (Tabela 2). Nas duas populações foi observado um excesso de heterozigotos e homozigotos sensíveis, o que produz o valor significativo dos desvios pelo teste χ^2 , mostrando que as segregações desviaram significativamente das proporções esperadas pelas leis Mendelianas.

No caso dos marcadores GF15-28 e GF15-30, ligados ao loco de resistência *Ren3*, a segregação tangenciou as proporções Mendelianas. Na população UFSC-2013-1 ambos marcadores segregaram na proporção de 89 homozigotos (*Ren3/Ren3*), 226 heterozigotos (*Ren3/ren3*) e 76 homozigotos (*ren3/ren3*) [$\chi^2 = 5,02$ ($P = 0,08$)], ocorrendo uma leve distorção de segregação. Na população UFSC-2013-2 onde se registraram 82 homozigotos (*Ren3/Ren3*), 100 heterozigotos (*Ren3/ren3*) e 27 homozigotos (*ren3/ren3*) [$\chi^2 = 29,33$ ($P = 4,266e-07$)], houve desvios significativos das proporções esperadas (Tabela 2).

Os desvios de segregação são comumente observados nos cruzamentos interespecíficos, que por muitos anos tem sido uma alternativa no melhoramento vegetal, já que proporcionam a introdução de genes de interesse, que muito provavelmente tem sofrido pressão de seleção contrária ou nunca estiveram nos tipos cultivados.

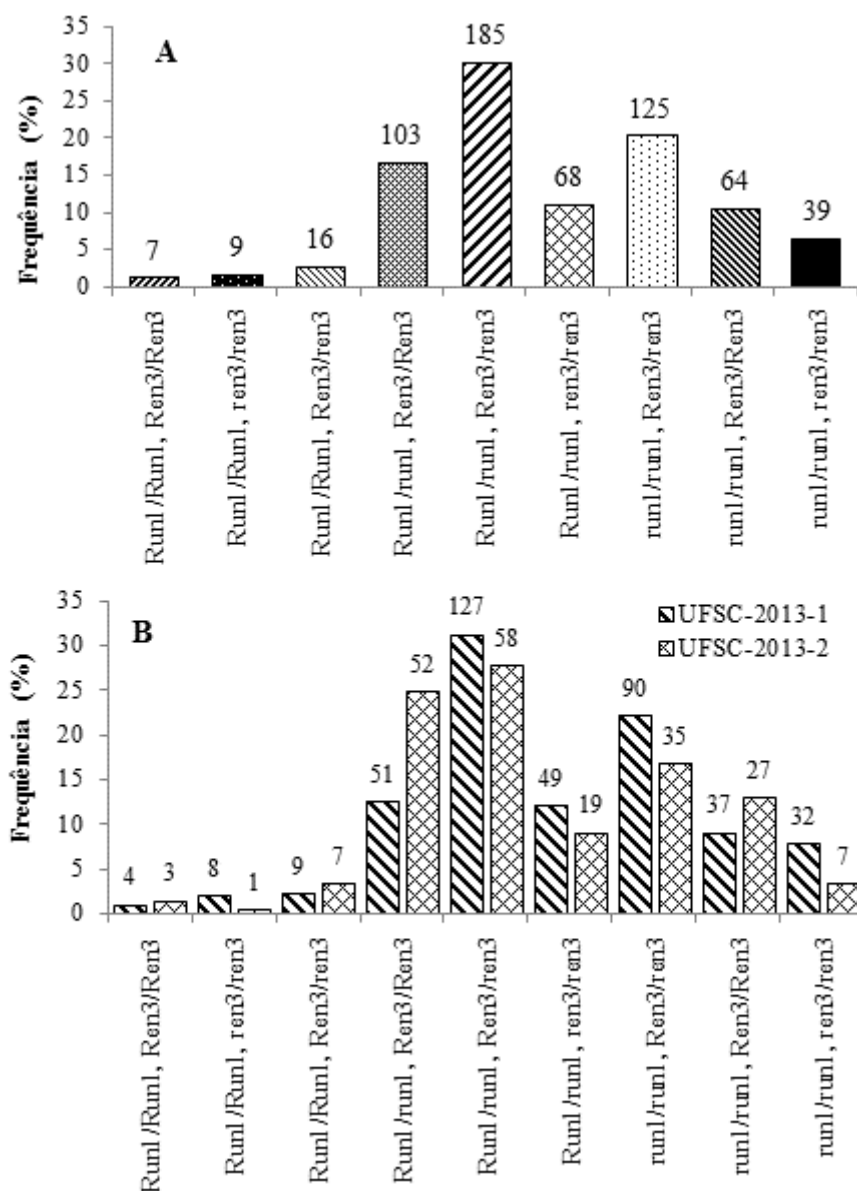


Figura 8. Distribuição de frequência em percentagem de nove genótipos com locos relacionados com a resistência ao oídio em 616 plantas provenientes das populações experimentais UFSC-2013-1 e UFSC-2013-2. A: plantas totais, B: plantas divididas por população.

Zamir e Tadmor (1986) estudando comparações entre cruzamentos intra e interespecíficos nos gêneros *Lens*, *Capsicum* e *Lycopersicum*, encontraram altas taxas de desequilíbrio de ligação, sugerindo que o desequilíbrio poderia aumentar com o nível de divergência genética entre os parentais. Assim também, Harushima *et al.* (1996) mencionaram que o desvio em relação a segregação mendeliana esperada tem sido frequentemente observado nos descendentes de híbridos intra e inter-espécies.

As populações avaliadas neste estudo são provenientes do cruzamento interespecífico entre a espécie *M. rotundifolia* x *V. vinifera*. Como o loco de resistência *Run1* é herdado de *M. rotundifolia*, nesta região pode estar havendo uma supressão de *crossing overs* devido à ausência de pareamento entre o DNA dos cromossomos homólogos.

Riaz *et al.* (2012) estruturaram mapas genéticos de ligação baseados em marcadores microssatélites, utilizando uma progênie de 206 plantas do cruzamento *M. rotundifolia* cv. Fry x *M. rotundifolia* cv. Trayshed. Os autores descobriram que o mapa de ‘Fry’ (parental masculino) tinha blocos de marcadores com segregação distorcida na extremidade inferior do cromossoma 8 e a extremidade superior dos cromossomas 11 e 14, bem como o mapa ‘Trayshed’ tinha um bloco de marcadores distorcidos na extremidade superior do cromossomo 4 e em uma pequena parte do cromossomo 12. É possível que no cromossomo 12 existam outros fatores genéticos que gerem distorção em *M. rotundifolia*, como constatado no presente trabalho.

Riaz *et al.* (2006), avaliando populações provenientes do cruzamento *V. rupestris* × *V. arizonica/girdiana*, encontraram três grupos de marcadores com segregação distorcida, observados nos grupos de ligação 6, 7 e 14, no mapeamento genético do loco *PdRI* que confere resistência à doença “Mal de Pierce”. Posteriormente, foi realizado um mapa genético refinado do cromossomo 14, que contém o loco de resistência à doença de Pierce. Foram encontradas altas taxas de distorção na segregação quando esses marcadores foram comparados com mapas baseados em *V. vinifera* no mesmo cromossomo, que também foram distorcidos, sugerindo o envolvimento de fatores gametofíticos, levando a identificação desta região como região distorção *Vitis-segregação* 1 (V-SDR1) (RIAZ *et al.*, 2008).

Em populações segregantes de cruzamentos interespecíficos ou comparações de mapas genéticos entre espécies tem sido observados desvios na segregação Mendeliana envolvendo: arroz var. *indica* x var. *japonica* (HARUSHIMA *et al.*, 1996; XU *et al.*, 1997), *O. sativa* x *O. glaberrima* (LORIEUX *et al.*, 2000), café (*C. pseudozanguebariae*

Bridson x *C. liberica* var. *dewevrei* (KY *et al.*, 2000), cítricos (*Citrus aurantium* x *Poncirus trifoliata* var. Flying Dragon, *C. volkameriana* x *P. trifoliata* var. Rubidoux e a autofecundação de *P. trifoliata* var. Flying Dragon (RUIZ e ASINS, 2003).

5.4. Desenvolvimento de “linhas” de videira homozigotas para locos de resistência ao míldio (*Plasmopara viticola*) e oídio (*Erysiphe necator*) piramidados

A genotipagem com os seis marcadores microssatélites ligados aos locos de resistência *Rpv1/Run1*, *Ren3* e *Rpv3*, (dois marcadores flanqueando cada um dos locos) permitiu classificar as plantas conforme os locos de resistência que apresentaram. Das 637 plantas genotipadas provenientes de duas populações, 32 apresentaram recombinação entre um dos marcadores microssatélites utilizados e ao menos um dos quatro locos de resistência (média aproximada de 0,5%). Embora foram desconsideradas da análise, a situação para o melhorista é de cautela, pois 5 plantas recombinantes vão ocorrer em cada 100.

Devido à ação gênica dominante simples esperada em cada um dos locos, oito fenótipos são produzidos. Para as 605 plantas não recombinantes (i) 231 plantas (38,2%) apresentaram a combinação de todos os locos de resistência (*Rpv1/Run1*, *Ren3*, *Rpv3*)¹, destacando que destas, apenas uma planta apresenta todos os locos de resistência em homozigose e nove delas carregam os dois locos de resistência para o míldio em homozigose e para o oídio um loco em homozigose e outro em heterozigose; (ii) setenta e sete plantas (12,8%) apresentaram a combinação *Rpv1/Run1*, *Ren3*, *rpv3*², sendo que destas, quatro plantas carregando os locos *Rpv1/Run1* e *Ren3* em homozigose, (iii) 65 plantas (10,7%) registraram a combinação *Rpv1/Run1*, *ren3*, *Rpv3*; (iv) 15 plantas (2,5%) apresentaram a combinação *Rpv1/Run1*, *ren3*, *rpv3*; (v) 151 plantas (25%) registraram *rpv1/run1*, *Ren3*, *Rpv3*, sendo 20 delas com os locos *Ren3* e *Rpv3* em homozigose; (vi) 30 plantas (5%) registraram a combinação *rpv1/run1*, *Ren3*, *rpv3*; (vii) 34 plantas (5,6%) com a combinação *rpv1/run1*, *ren3*, *Rpv3* e (viii) duas plantas (0,33%) apresentaram ausência completa dos locos de resistência (*rpv1/run1*, *ren3*, *rpv3*) (Figura 9A).

¹ Primeira letra maiúscula indica presença do loco de resistência.

² Primeira letra minúscula indica ausência do loco de resistência.

Tabela 2. Proporções obtidas e teste de qui-quadrado para marcadores que ancoram locos de resistência ao oídio em duas populações segregantes de videira obtidas por autofecundação da F₁.

Populações	Número de plantas	Marcadores: Sc34_8/Sc35_2			χ^2 (1:2:1)	Marcadores: GF15-28 / GF15-30			χ^2 (1:2:1)
		<i>Run1/Run1</i>	<i>Run1/run1</i>	<i>run1/run1</i>		<i>Ren3/Ren3</i>	<i>Ren3/ren3</i>	<i>ren3/ren3</i>	
UFSC-2013-1	407	21	227	159	99,01 $P= 2,2\text{e-}16$	92	226	89	5,0197 ($P= 0,08$)
UFSC-2013-2	209	11	129	69	43,68 $P= 3,27\text{e-}10$	82	100	27	29,33 ($P= 4,26\text{e-}07$)

Foi constatado também que nas duas populações experimentais (UFSC-2013-1 e UFSC-2013-2) foram obtidos proporções similares na piramidação de todos os locos de resistência com 150 e 81 plantas, respectivamente (Figura 9B). Este resultado é de extrema relevância, pois estas 231 plantas serão multiplicadas vegetativamente e implantadas a campo, onde serão avaliadas quanto a caracteres agrônômicos e potencial enológico, além da resistência genética às doenças, sob pressão natural dos patógenos.

Assim, a genotipagem permitiu não só a diminuição, de aproximadamente 2/3, da população a ser levada a campo, de 637 para 231, representando 36% das plantas originalmente obtidas, mas também a identificação de homozigotos e heterozigotos. Esta discriminação entre homozigotos e heterozigotos é de extrema importância para a seleção já que na seleção fenotípica não é possível esta discriminação em características com dominância. Em outras palavras, a genotipagem aumenta a eficiência da seleção.

É importante mencionar que a linha de melhoramento VHR 3082-1-42, que carrega os locos de resistência *Rpv1/Run1* tem sido aprimorada há mais de uma década (PAUQUET *et al.*, 2001; BACKER *et al.*, 2005). Por sua vez, a variedade comercial Regente, que é cultivada na Alemanha desde 1996, apresenta os locos *Ren3* e *Rpv3*. Além disso, VHR 3082-1-42 apresenta elevado potencial enológico (FISHER *et al.*, 2004; EIBACH *et al.*, 2007; WELTER *et al.*, 2007). Conforme mencionado, foram identificadas várias plantas contendo alelos de resistência nos quatro locos, portanto, piramidados. Devido ao potencial enológico dos parentais utilizados, espera-se que as progênie selecionadas neste estudo (com os quatro locos de resistência), também irão apresentar um elevado potencial enológico.

Em videira, Eibach *et al.* (2007) obtiveram plantas resistência ao oídio e ao míldio, por meio da piramidação dos locos *Rpv1/Run1*, *Ren3* e *Rpv3*. Os autores, com base em dados fenotípicos, identificaram 20 plantas segregantes livres de infecções de ambas as doenças. Estes resultados foram confirmados por meio da genotipagem, que permitiu identificar dentre estes 20 genótipos, um subconjunto de quatro plantas que carregavam todos os alelos de resistência, indicando que os locos de resistência para ambas as doenças foram efetivamente combinados. Posteriormente, Schwander *et al.* (2012) em uma sub-população F₁ contendo os locos de resistência combinados (*Rpv3* e *Rpv10*) contra o míldio, mostraram significativamente um maior grau de resistência, o que indica efeitos aditivos por piramidação de locos de resistência. Assim também, Venuti *et al.* (2013) mencionam que os alelos de

resistência Rpv3 e Rpv12 contra o míldio, foram piramidados por seleção fenotípica, devido ao efeito aditivo de *Rpv12* com *Rpv3*.

Mediante o uso de ferramentas moleculares, a piramidação de genes de resistência tem sido um sucesso em várias culturas, combinando vários genes contra diversas doenças: *Pyricularia grisea* Sacc em arroz (TAPIERO *et al.*, 2003; HITTALMANI *et al.*, 2000); ferrugem em feijão (KELLY *et al.*, 1994; 1995; RAGAGNIN *et al.*, 2003); vírus do mosaico e ferrugem-asiática em soja (SHI *et al.*, 2009; MAPHOSA *et al.*, 2012); helmintosporiose comum e carvão do pendão em milho (MIN *et al.*, 2012); oídio em trigo (LIU *et al.*, 2000), entre outros. A piramidação de genes também tem sido utilizada para características agrônômicas em diversas culturas. Exemplo disso são: centeio (TWARDOWSKA *et al.*, 2005), tomate (SACCO *et al.*, 2013) e pepino (ROBBINS *et al.*, 2008).

O sucesso do presente estudo foi identificar uma planta contendo alelos de resistência em homozigose nos quatro locos, portanto piramidados (*Rpv1/Rpv1*, *Run1/Run1*, *Ren3/Ren3*, *Rpv3/Rpv3*), pertencente à população UFSC-2013-1 (uvas tintas) e nove delas carregam os dois locos de resistência para o míldio em homozigose e para o oídio um loco em homozigose e outro em heterozigose (*Rpv1/Rpv1*, *Run1/Run1*, *Ren3/ren3*, *Rpv3/Rpv3*), sendo que destas nove, oito são provenientes da população UFSC-2013-1 (uvas tintas) e uma da população UFSC-2013-2 (uvas brancas). Estas plantas por conter mais do 95% do genoma de *V. vinifera* e os alelos de resistência para o controle das principais moléstias da videira, as fazem desejáveis em qualquer programa de melhoramento genético, que busca o desenvolvimento de variedades resistentes com elevadas qualidade enológica. Razão pela qual se consideram os resultados deste estudo satisfatórios na contribuição do melhoramento genético para obter variedades mais resistentes a estas doenças.

Ao ser o míldio o principal problema na região Sul do Brasil, espera-se com estas plantas realizar cruzamentos com variedades tradicionais do Sul, e assim, produzir variedades com melhor tolerância às doenças e de excelente qualidade, adaptadas aos ambientes de cultivo, visando a produção de uva tanto para vinho como para mesa.

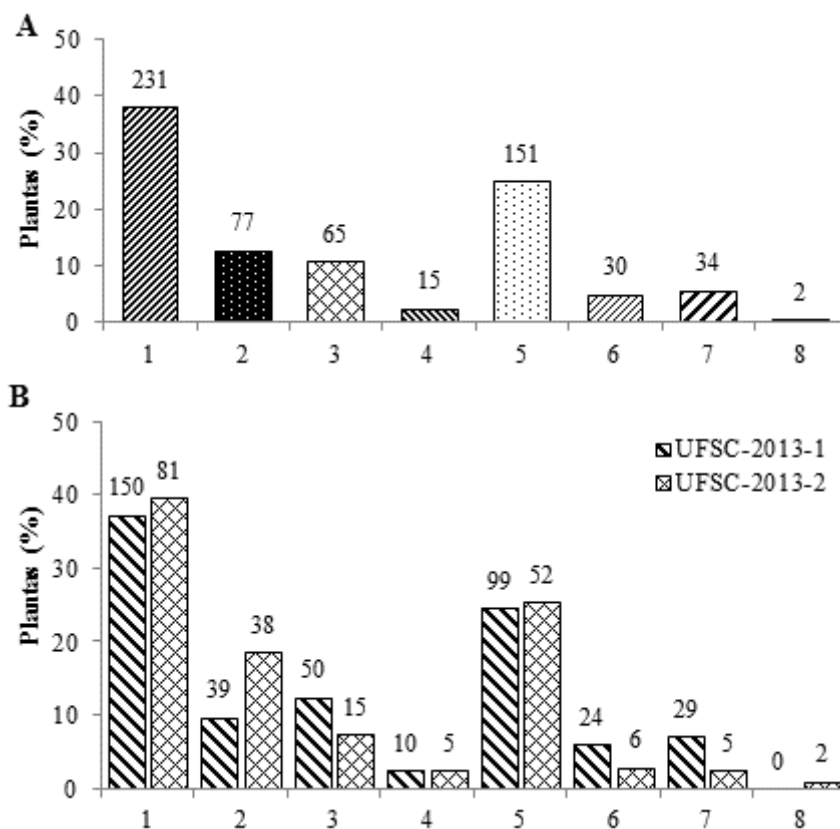


Figura 9. Piramidação dos locos de resistência *Rpv1/Run1*, *Ren3* e *Rpv3*, em duas populações experimentais UFSC-2013-1 e UFSC-2013-2. A: plantas totais, B: plantas divididas por população.

Legenda:

- 1: Plantas contendo todos os locos de resistência ao míldio e ao oídio (*Rpv1/Run1*, *Ren3* e *Rpv3*).
- 2: Plantas que possuem o loco *Rpv1* com resistência ao míldio e os locos *Run1* e *Ren3* que conferem resistência ao oídio.
- 3: Plantas que apresentam os locos *Rpv1* e *Rpv3* com resistência ao míldio e *Run1* conferindo resistência ao oídio.
- 4: Plantas que contem os locos *Rpv1* e *Run1* com resistência ao míldio e ao oídio, respectivamente.
- 5: Plantas que apresentam os locos *Rpv3* e *Ren3* com resistência ao míldio e oídio, respectivamente.
- 6: Plantas que possuem o loco *Ren3* com resistência ao oídio.
- 7: Plantas que carregam o loco *Rpv3* com resistência ao míldio.
- 8: Plantas com ausência de todos os locos de resistência estudados.

6. CONCLUSÕES

Apesar da distorção de segregação nos marcadores microssatélites Sc34_8 e Sc35_2 usados para a seleção de plantas carregando os alelos *Rpv1/Run1*, o uso dos seis marcadores de microssatélites e reações multiplex de PCR permitiu identificar e selecionar plantas com os locos de resistência *Rpv1/Run1*, *Ren3* e *Rpv3* piramidados. O presente estudo comprova que a piramidação de genes de resistência é possível, bem como as vantagens do uso de SAM combinado com o método convencional, particularmente a seleção genotípica e a diminuição do tamanho populacional a ser testado a campo.

Foi possível selecionar uma planta carregando todos os locos de resistência em homozigose, o que permitirá realizar novos cruzamentos com variedades de importância econômica e adaptadas aos ambientes do sul do Brasil, cujas progênies herdarão os alelos de resistência.

Foram identificadas nove delas carregam os dois locos de resistência para o míldio em homozigose e para o oídio um loco em homozigose e outro em heterozigose. Sendo o míldio a principal moléstia na região Sul do Brasil, estas plantas são importantes nos programas de melhoramento do Sul, porque contribuirão na formação de novas variedades com maior tolerância à doença. Como o loco *Rpv1* confere resistência completa ao míldio, espera-se que as progênies derivadas destas plantas também sejam resistentes ao oídio.

Particularmente, as plantas selecionadas neste estudo são de grande importância para o programa de melhoramento de videira da UFSC e serão utilizadas em novos ciclos de cruzamento com variedades *V. vinifera* de importância econômica do Brasil, buscando associar resistência a doenças com atributos de qualidade da uva para distintas finalidades.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Os avanços obtidos pelo presente estudo permitem adentrar nas perspectivas futuras do programa de melhoramento da videira da UFSC, Campus Curitibanos. Dentre as diversas atividades que seriam pertinentes realizar cabe destacar as seguintes:

- 1: É relevante realizar a avaliação fenotípica das plantas ao oídio em casa-de-vegetação, para confirmar a informação genética obtida em laboratório. A razão decorre do fato que os genes de resistência podem expressar níveis de resistência diferenciados em distintos *background* genéticos. Além disso, esta avaliação ainda não foi feita.
- 2: Uma vez identificadas as plantas portadoras dos locos com alelos de resistência, o próximo passo seria a realização de cruzamentos entre tais plantas selecionadas e variedades viníferas adaptadas às zonas do Sul do Brasil. Assim, aumenta-se a presença do genoma das uvas viníferas nas progênes, potencializando o desenvolvimento de novas variedades para produção de vinhos finos com menor uso de agrotóxicos.
- 3: Entretanto, a realização de estudos enológicos das plantas com todos os locos de resistência piramidados, e de suas futuras progênes, é imperativo, pois a verificação da qualidade da fruta produzida e do vinho decorrente é ainda o maior critério na escolha das variedades para produção de vinho fino.
- 4: Por último, a continuação da piramidação de genes de resistência a doenças e a pragas seria muito desejável, já que neste caso a produção de uvas dependeria muito menos do uso de agrotóxicos, substâncias que apresentam situações de riscos a saúde humana e efeitos adversos ao meio ambiente.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAM-BLONDON, A.F.; ROUX, C.; CLAUX, D.; BUTTERLIN, G.; MERDINOGLU, D.; THIS P. Mapping 245 SSR markers on the *Vitis vinifera* genome: a tool for grape genetics. **Theoretical and Applied Genetics** 109: 1017–1027. 2004.

ALLEWELDT, G.; POSSINGHAM, J. V. Progress in grapevine breeding. **Theoretical and Applied Genetics** 75: 669–673. 1988.

ALZATE-MARIN, A.L.; CERVIGNI, G.D.L.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Seleção Assistida por Marcadores Moleculares Visando ao Desenvolvimento de Plantas Resistentes a Doenças, com Ênfase em Feijoeiro e Soja. **Fitopatologia Brasileira** 30(4): 333–342. 2005.

ARNOLD, C.; GILLET, F.; GOBAT, J.M. Situation de la vigne sauvage *Vitis vinifera* sub sp. *silvestris* en Europe. **Vitis** 37: 159–170. 1998.

AZOFEIFA-DELGADO, Á. Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. **Agronomía Mesoamericana** 17(2): 221–242. 2006.

BARKER, C.L.; DONALD, T.; PAUQUET, J.; RATNAPARKHE, A.; BOUQUET, A.; ADAM-BLONDON, A.F.; THOMAS, M.R.; DRY, I. Genetic and physical mapping of the grapevine powdery mildew resistance gene, *Run1*, using a bacterial artificial chromosome library. **Theoretical and Applied Genetics** 111:370–377. 2005.

BELLIN, D.; PERESSOTTI, E.; MERDINOGLU, D.; WIEDEMANN-MERDINOGLU, S.; ADAM-BLONDON, A.F.; CIPRIANI, G.; MORGANTE, M.; TESTOLIN, R.; DI GASPERO, G. Resistance to Plasmopara viticola in grapevine ‘Bianca’ is controlled by a major dominant gene causing localized necrosis at the infection site. **Theoretical and Applied Genetics** 120:163–176. 2009.

BENDEK, C.E.; CAMPBELL, P.A.; TORRES, R.; DONOSO, A.; LATORRE, B.A. The risk assessment index in grape powdery mildew control decisions and the effect of temperature and humidity on conidial germination of *Erysiphe necator*. **Spanish Journal of Agricultural Research** 5(4): 522–532. 2007.

BERED, F.; NETO, J.F.B.; CARVALHO, F.I.F. Marcadores moleculares e sua aplicação no melhoramento genético de plantas. **Ciência Rural** 27(2): 513-520. 1997.

BLASI, P.; BLANC, S.; WIEDEMANN-MERDINOGLU, S.; PRADO, E.; RÜHL, E.H.; MESTRE, P.; · MERDINOGLU, D. Construction of a reference linkage map of *Vitis amurensis* and genetic mapping of *Rpv8*, a locus conferring resistance to grapevine downy mildew. **Theoretical and Applied Genetics** 123:43–53. 2011.

BRUNELLI, K.R.; SILVA, H.P.; CAMARGO, L.E.A. Mapeamento de genes de resistência quantitativa a *Puccinia polysora* em milho. **Fitopatologia Brasileira** 27: 134-140. 2002.

CADLE-DAVIDSON, L. Variation within and between *Vitis* spp. for foliar resistance to the downy mildew pathogen *Plasmopara viticola*. **Plant Disease** 92:1577-1584. 2008.

CAFFI, T.; ROSSI, V.; BUGIANI, R. Evaluation of a warning system for controlling primary infections of grapevine downy mildew. **Plant Disease** 94:709-716. 2010.

CALONNEC, A.; CARTOLARO, P.; POUPOT, C.; DUBOURDIEU, D.; DARRIET, P. Effects of *Uncinula necator* on the yield and quality of grapes (*Vitis vinifera*) and wine. **Plant Pathology** 53: 434–445. 2004.

CAMARGO, U.A.; TONIETTO, J.; HOFFMANN, A. Progressos na viticultura brasileira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Volume Especial, E. 144-149. 2011.

CAMPBELL, P.; BENDEK, C.; LATORRE, B.A. Riesgo de oídio (*Erysiphe necator*) de la vid en relación con el desarrollo de los racimos. **Ciencia e Investigacion Agraria** 34(1): 5-11. 2007.

CARANTA, C.; THABUIS, A.; PALLOIX, A. Development of a CAPS marker for the *Pvr4* locus: A tool for pyramiding potyvirus resistance genes in pepper. **Genome** 42: 1111–1116. 1999.

CARCAMO, C.; PROVEDO, I.; ARROYO-GARCÍA, R. Detection of polymorphism in ancient Tempranillo clones (*Vitis vinifera* L.) using

microsatellite and retrotransposon markers. **Iranian journal of biotechnology** 8 (1): 1-6. 2010.

CARROLL, J.E.; WILCOX, W.F. Effects of humidity on the development of grapevine powdery mildew. **Phytopathology** 93:1137-1144. 2003.

CASAGRANDE, K.; FALGINELLA, L.; CASTELLARIN, S.D.; TESTOLIN, R.; DI GASPERO, G. Defence responses in Rpv3-dependent resistance to grapevine downy mildew. **Planta** 234:1097-1109. 2011.

CHAVARRIA, G.; SANTOS, H.P.; SÔNEGO, O.R.; MARODIN, G.A.B.; BERGAMASCHI, H.; CARDOSO, L.S. Incidência de doenças e necessidade de controle em cultivo protegido de videira. **Revista Brasileira de Fruticultura** 29(3): 477-482. 2007.

CHAVARRIA, G.; SANTOS, H.P. Manejo de videiras sob cultivo protegido. **Ciência Rural** 39(6): 1917-1924. 2009.

COLLARD, B.C.Y.; JAHUFER, M.Z.Z.; BROUWER, J.B.; PANG E.C.K. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. **Euphytica** 142: 169-196. 2005.

CRUZ, M. **Oídio de la vid**. Pp. 361-380. Em: Stadnik, M. J. e Rivera, M.(Edts). Oídios. EMBRAPA, Jaguariúna, SP, Brasil. 2001. p. 361-380.

CZERMAINSKI A.B.C.; SÔNEGO O.R. Influência das condições climáticas sobre a eficácia de fungicidas empregados para o controle do míldio em *Vitis vinifera*. **Ciência Rural** 34(1): 5-11. 2004.

DI GASPERO, G.; CIPRIANI, G.; MARRAZZO, M.T.; ANDREETTA, D.; PRADO-CASTRO M.J.; PETERLUNGER, E.; TESTOLIN, R. Isolation of (AC)n-microsatellites in *Vitis vinifera* L. and analysis of genetic background in grapevines under marker assisted selection. **Molecular Breeding** 15:11-20. 2005.

DI GASPERO, G.; CATTONARO, F. Application of genomics to grapevine improvement. **Australian Journal of Grape and Wine Research** 16: 122-130. 2010.

DOLIGEZ, A.; ADAM-BLONDON, A.F.; CIPRIANI, G.; DI GASPERO, G.; LAUCOU, V.; MERDINOGLU, D.; MEREDITH, C.P.; RIAZ, S.; ROUX, C.; THIS, P. An integrated SSR map of grapevine based on five mapping populations. **Theoretical and Applied Genetics** 113:369–382. 2006.

EIBACH, R. Investigations about the genetic resources of grapes with regard to resistance characteristics to powdery mildew (*oidium tuckeri*). **Vitis** 33:143-150. 1994.

EIBACH, R.; ZYPRIAN, E.; WELTER, L.; TÖPFER, R. The use of molecular markers for pyramiding resistance genes in grapevine breeding. **Vitis** 46 (2): 120–124. 2007.

FATHI, H.; KHIAMI.H.K. Study of biology and epidemiology of *Uncinula necator* caused powdery mildew disease. **Technical Journal of Engineering and Applied Sciences** 2 (3): 56-61. 2012.

FERREIRA, C.F.; BORÉM, A.; CARVALHO, G.A.; NIETSCH, S.; JÚNIOR, T.J.P.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Identificação de marcador RAPD ligado ao gene de resistência à raça 63.39 DA mancha-angular do feijoeiro. **Bragantia** 58(2): 247-252. 1999.

FESSLER, C.; KASSEMAYER, H.H. The influence of temperature during the development of conidia on the germination of *Uncinula necator*. **Vitis** 34 (1): 63-64. 1995.

FISCHER, B.M.; SALAKHUTDINOV, I.; AKKURT, M.; EIBACH, R.; EDWARDS, K.J.; TÖPFER, R.; ZYPRIAN E.M. Quantitative trait locus analysis of fungal disease resistance factors on a molecular map of grapevine. **Theoretical and Applied Genetics** 108: 501–515. 2004.

FRANCIA, E.; TACCONI, G.; CROSATTI, C.; BARABASCHI, D.; BULGARELLI, D.; DALL'AGLIO, E.; VALE, G. Marker assisted selection in crop plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 82: 317–342. 2005.

GADOURY, D.M.; SEEM, R.C.; PEARSON, R.C.; WILCOX, W.F.; DUNST, R.M. Effects of powdery mildew on vine growth, yield, and quality of Concord grapes. **Plant Dis** 85:137-140. 2001.

GADOURY, D.M.; CADLE-DAVIDSON, L.; WILCOX, W.F.; DRY, I.B.; SEEM, R.C.; MILGROOM, M.G. Grapevine powdery mildew (*Erysiphe necator*): a fascinating system for the study of the biology, ecology and epidemiology of an obligate biotroph. **Molecular Plant Pathology** 13(1): 1–16. 2012.

GARRIDO, L.R.; SÔNEGO, O.R. Míldio da Videira. **Revista Cultivar Hortaliças e Frutas** 2(11): 22-23. 2002.

GARZÓN, L.N.; BLAIR, M.W.; LIGARRETO, G.A. Uso de selección asistida con marcadores para resistencia a antracnosis en frijol común. **Agronomía Colombiana** 25 (2): 207-214. 2007.

GENTA, W.; TESSMANN, D.J.; ROBERTO, S.R.; VIDA, J.B.; COLOMBO, L.A.; SCAPIN, C.R.; RICCE, W.S.; CLOVIS, L.R. Manejo de míldio no cultivo protegido de videira de mesa 'BRS Clara'. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 45(12): 1388-1395. 2010.

GILL-LANGARICA, H.R.; MAYEK-PÉREZ, N. Los marcadores moleculares en el mejoramiento genético de la resistencia a enfermedades del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.): aplicaciones y perspectivas. **Revista Mexicana de Fitopatología** 26 (2):164-176. 2008.

GREENBERG, R.; CROW, J.F. A comparison of the effect of lethal and detrimental chromosomes from *Drosophila* populations. **Genetics** 45(8): 1153-1168. 1960.

HAMADA, E.; GHINI, R.; ROSSI P.; JÚNIOR M.J.P.; FERNANDES, J.L. Climatic risk of grape downy mildew (*Plasmopara viticola*) for the state of São Paulo, Brazil. **Scientia Agricola** 65: 60-64. 2008.

HARUSHIMA, Y.; KURATA, N.; YANO, M.; NAGAMURA, Y.; SASAKI, T.; MINOBE Y.; NAKAGAHARA, M. Detection of segregation distortions in an indica-japonica rice cross using a high-resolution molecular map. **Theoretical and Applied Genetics** 92:145-150. 1996.

HITTALMANI, S.; PARCO, A.; MEW, T.V.; ZEIGLER, R.S.; HUANG, N. Fine mapping and DNA marker-assisted pyramiding of the

three major genes for blast resistance in rice. **Theoretical and Applied Genetics** 100:1121–1128. 2000.

HUANG, N.; ANGELES, E.R.; DOMINGO, J.; MAGPANTAY, G.; SINGH, S.; ZHANG, G.; KUMARAVADIVEL, N.; BENNETT, J., KHUSH, G.S. Pyramiding of bacterial blight resistance genes in rice: marker-assisted selection using RFLP and PCR. **Theoretical and Applied Genetics** 95: 313-320. 1997.

IBÁÑEZ, J.; VARGAS, A.M.; PALANCAR, M.; BORREGO, J.; ANDRÉS, M.T. Genetic relationships among table-grape varieties. **American Journal of Enology and Viticulture** 60: 35– 42. 2009.

JOSHI, R.K.; NAYAK, S. Gene pyramiding-A broad spectrum technique for developing durable stress resistance in crops. **Biotechnology and Molecular Biology Review** 5(3): 51-60. 2010.

JÜRGES, G.; KASSEMAYER, H.-H.; DÜRRENBARGER, M.; DÜGGELIN, M.; NICK, P. The mode of interaction between *Vitis* and *Plasmopara viticola* Berk. & Curt. Ex de Bary depends on the host species. **Plant Biology** 11:886–898. 2009.

KARATAS, H.; DEGIRMENCI, D.; VELASCO, R.; VEZZULLI, S.; BODUR C.; AGAOGLU, Y.S. Microsatellite fingerprinting of homonymous grapevine (*Vitis vinifera* L.) varieties in neighboring regions of South-East Turkey. **Scientia Horticulturae** 114: 164–169. 2007.

KELLY, J.; AFANADOR, L.; HALEY, S.; MIKLAS, P. Uso de marcadores moleculares en el mejoramiento del frijol. **Agronomía Mesoamericana** 5: 1-7. 1994.

KELLY, J.D.; AFANADOR, L.; HALEY, S.D. Pyramiding genes for resistance to bean common mosaic virus. **Euphytica** 82: 207-212. 1995.

KHIAVI, H.K.; SHIKHLINSKI, H.; AHARI, A.B.; HEYDARI, A. Evaluation of different grape varieties for resistance to powdery mildew caused by *uncinula necator*. **Journal of Plant Protection Research** 49(4): 434-439. 2009.

KHIAVI, H.K.; SHIKHLINSKIY, H.; AHARI, A.B.; AKRAMI, M. Evaluation of different grape varieties for resistance to powdery mildew caused by *Uncinula necator*. **African Journal of Agricultural Research** 7(29): 4182-4186. 2012.

KORTEKAMP, A.; WELTER, L.; VOGT, S.; KNOLL, A.; SCHWANDER, F.; TÖPFER, R.; ZYPRIAN, E. Identification, isolation and characterization of a CC-NBS-LRR candidate disease resistance gene family in grapevine. **Molecular Breeding** 22(3): 421-432. 2008.

KUMAR, S.; GILL, B.S.; FARIS, J.D. Identification and characterization of segregation distortion loci along chromosome 5B in tetraploid wheat. **Molecular Genetics and Genomics** 278:187–196. 2007.

KY, C.-L.; BARRE, P.; LORIEUX, M.; TROUSLOT, P.; AKAFFOU, S.; LOUARN, J.; CHARRIER, A.; HAMON, S.; NOIROT, M. Interspecific genetic linkage map, segregation distortion and genetic conversion in coffee (*Coffea* sp.). **Theoretical and Applied Genetics** 101:669–676. 2000.

LEÃO, P.C.S.; RIAZ, S.; GRAZIANI, R.; DANGL, G.S.; MOTOIKE, S.Y.; WALKER, M.A. Characterization of a Brazilian Grape Germplasm Collection Using Microsatellite Markers. **American Journal of Enology and Viticulture** 60: 517-524. 2009

LEÃO, P.C.S.; BRANDÃO, E.O.; GONÇALVES, N.P.S. Caracterização agrônômica e molecular do clone Itália Muscat no submédio do vale do São Francisco. **Revista Brasileira de Fruticultura** 33 (1): 297-302. 2011.

LIU, J.; LIU, D.; TAO, W.; LI, W.; WANG, S.; CHEN, P.; CHENG, S.; GAO, D. Molecular marker facilitated pyramiding of different genes for powdery mildew resistance in wheat. **Plant Breeding** 119, 21-24. 2000.

LORIEUX, M.; NDJIONDJOP, M.-N.; GHESQUIÈRE, A. A first interspecific *Oryza Sativa* x *Oryza glaberrima* microsatellite-based genetic linkage map. **Theoretical and Applied Genetics** 100:593-601. 2000.

LU, H.; ROMERO-SEVERSON, J.; BERNARDO, R. Chromosomal regions associated with segregation distortion in maize. **Theoretical and Applied Genetics** 105:622–628. 2002.

LYTTLE, T.W. Segregation distorters. **Annual Review of Genetics** 25: 511-557. 1991.

MAPHOSA, M.; TALWANA, H.; TUKAMUHABWA, P. Enhancing soybean rust resistance through Rpp2, Rpp3 and Rpp4 pair wise gene pyramiding. **African Journal of Agricultural Research** 7(30): 4271-4277. 2012.

MARTÍNEZ, L.E.; CAVAGNARO, P.F.; MASUELLI, R.W.; ZÚÑIGA, M. SSR-based assessment of genetic diversity in South American *Vitis vinifera* varieties. **Plant Science** 170: 1036–1044. 2006.

MARTÍNEZ, L.; CAVAGNARO, P.; MASUELLI, R. Caracterización molecular de variedades de vid (*Vitis vinifera* L.) de calidad enológica por marcadores microssatélites. **Revista de Facultad de Ciencias Agrarias UNCuyo** 38(1): 77-86. 2006.

MATASCI, C.L.; GOBBIN D.; SCHÄRER, H.J.; TAMM L.; GESSLER, C. Selection for fungicide resistance throughout a growing season in populations of *Plasmopara viticola*. **European Journal of Plant Pathology** 120:79–83. 2008.

MATSUBARA, K.; EBANA, K.; MIZUBAYASHI, T.; ITOH, S.; ANDO, T.; NONOUE, Y.; ONO, N.; SHIBAYA, T.; OGISO, E.; HORI, K.; FUKUOKA, S.; YANO, M. Relationship between transmission ratio distortion and genetic divergence in intraspecific rice crosses. **Molecular Genetics and Genomics** 286:307–319. 2011.

MAZUR, B.J.; TINGEY, S.V. Genetic mapping and introgression of genes of agronomic importance. **Plant biotechnology** 6:175- 182. 1995.

MERDINOGLU, D.; BUTTERLIN, G.; BEVILACQUA, L.; CHIQUET, V.; ADAM-BLONDON, A.F.; AND DECROOCQ, S. Development and characterization of a large set of microsatellite markers in grapevine (*Vitis vinifera* L.) suitable for multiplex PCR. **Molecular Breeding** 15: 349–366. 2005.

MIGLIARO, D.; MORREALE, G.; GARDIMAN, M.; LANDOLFO, S.; CRESPIAN, M. Direct multiplex PCR for grapevine genotyping and varietal identification. **Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization** 1– 4 doi:10.1017/S1479262112000433. 2012.

MILACH, S.C.K.; CRUZ, R.P. Piramidização de genes de resistência às ferrugens em cereais. **Ciência Rural** 27(4): 685-689. 1997.

MIN, J.; CHUNYU, Z.; KHALID, H.; NAN, L.; QUAN, S.; QING, M.; SUWEN, W.; FENG, L. Pyramiding resistance genes to northern leaf blight and head smut in maize. **International journal of agriculture & biology** 14: 430–434. 2012.

MORENO-SANZ, P.; LOUREIRO, M.D.; SUÁREZ, B. Microsatellite characterization of grapevine (*Vitis vinifera* L.) genetic diversity in Asturias (Northern Spain). **Scientia Horticulturae** 129: 433–440. 2011.

NELSON, R.R. Genetics of horizontal resistance to plant diseases. **Annual Review of Phytopathology** 16: 359-378. 1978.

OLIVEIRA P.R.D.; SCOTTON, D.C.; NISHIMURA, D.S.; FIGUEIRA, A. Análise da diversidade genética por AFLP e identificação de marcadores associados à resistência a doenças em videira. **Revista Brasileira de Fruticultura** 27(3): 454-457. 2005.

OLIVEIRA, E.J.; PÁDUA, J.G.; ZUCCHI, M.I.; VENCOSKY, R.; VIEIRA, M.L.C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology** 29 (2): 294-307. 2006.

OLMO, H.P. The potential role of (*vinifera x rotundifolia*) hybrids in grape variety improvement. **Experientia** 42: 921-926. 1986.

PAUQUET, J.; BOUQUET, A.; THIS, P.; ADAM-BLONDON, A. F. Establishment of a local map of AFLP markers around the powdery mildew resistance gene Runlin grapevine and assessment of their usefulness for marker assisted selection. **Theoretical and Applied Genetics** 103: 1201-1210. 2001.

PEDERSEN, W. L.; LEATH, S. Pyramiding major genes for resistance to maintain residual effects. **Annual Review of Phytopathology** 26:369-378, 1988.

PERUCH, L.A.M.; BRUNA E.D. Relação entre doses de calda bordalesa e de fosfito potássico na intensidade do míldio e na produtividade da videira cv. 'Goethe'. **Ciência Rural** 38(9): 2413-1418. 2008.

PORTER, D.R.; BURD, J.D.; SHUFRAN, K.A.; WEBSTER, J.A. Efficacy of Pyramiding Greenbug (Homoptera: Aphididae) Resistance Genes in Wheat. **Journal of Economic Entomology** 93(4):1315-1318. 2000.

R Development Core Team. R: **A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2013. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.

RAGAGNIN, V.A.; ALZATE-MARIN, A.L.; SOUZA, T.L.P.O.; ARRUDA, K.M.A.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Avaliação da resistência de isolinhas de feijoeiro ao *Colletotrichum lindemuthianum*, *Uromyces appendiculatus* e *Phaeoisariopsis griseola*. **Fitopatologia Brasileira** 28: 591-596. 2003.

RAMMING, D.W.; GABLER, F.; SMILANICK, J.; CADLE-DAVIDSON, M.; BARBA, P.; MAHANIL, S.; CADLE-DAVIDSON, L. A single dominant locus, Ren4, confers rapid non-race-specific resistance to grapevine powdery mildew. **Phytopathology** 101:502-508. 2011.

REYNIER, A. **Manual de Viticultura**. Mundi-Prensa. 5ta ED. Bilbao, España. 1995, 407 p.

RIAZ, S.; DANGL, G.S.; EDWARDS, K.J.; MEREDITH, C.P. A microsatellite marker based framework linkage map of *Vitis vinifera* L. **Theoretical and Applied Genetics** 108:864–872. 2004.

RIAZ, S.; KRIVANEK, A.F.; XU, K.; WALKER, M.A. Refined mapping of the Pierce's disease resistance locus, *PdR1*, and Sex on an extended genetic map of *Vitis rupestris* x *V. arizonica*. **Theoretical and Applied Genetics** 113: 1317–1329. 2006.

RIAZ, S.; TENSCHER, A.C.; RUBIN, J.; GRAZIANI, R.; PAO, S.S.; WALKER, M.A. Fine-scale genetic mapping of two Pierce's disease resistance loci and a major segregation distortion region on chromosome 14 of grape. **Theoretical and Applied Genetics** 117:671–681. 2008.

RIAZ, S.; HU, R.; WALKER, M.A. A framework genetic map of *Muscadinia rotundifolia*. **Theoretical and Applied Genetics** 125 (6): 1195-1210. 2012.

ROBBINS, M.D.; CASLER, M.D.; STAUB, J.E. Pyramiding QTL for multiple lateral branching in cucumber using inbred backcross lines. **Molecular Breeding** 22:131–139. 2008.

ROBERTO, S.R.; COLOMBO, L.A.; ASSIS, A.M. Revisão: Cultivo protegido em viticultura. **Ciência e Técnica Vitivinícola** 26 (1) 11-16. 2011.

RUIZ, C.; ASINS, M.J. Comparison between *Poncirus* and *Citrus* genetic linkage maps. **Theoretical and Applied Genetics** 106:826–836. 2003.

SACCO, A.; DI MATTEO, A.; LOMBARDI, N.; TROTTA, N.; PUNZO, B.; MARI, A.; BARONE, A. Quantitative trait loci pyramiding for fruit quality traits in tomato. **Molecular Breeding** 31: 217–222. 2013.

SANTOS-NETO, J.R.A. Melhoramento da videira. **Bragantia** 14(23): 237-267. 1955.

SCHORI, M.; APPEL, M.; KITKO, A.; SHOWALTER, A.M. Engineered DNA polymerase improves PCR results for plastid DNA. **Applications in Plant Sciences** 1 (2): 1200519. 2013.

SCHUCK, M.R.; MOREIRA, F.M.; GUERRA, M.P.; VOLTOLINI, J.A.; GRANDO, M.S.; SILVA, A.L. Molecular characterization of grapevine from Santa Catarina, Brazil, using microsatellite markers. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 44(5): 487-495. 2009.

SCHUCK, M.R.; MOREIRA, F.M.; VOLTOLINI, J.A.; GUERRA, M.P.; RANDO, M.S.; SILVA, A.L. Identificação molecular da uva

‘goethe’ de Urussanga-SC por marcadores microsatélites. **Revista Brasileira de Fruticultura** 32 (3): 825-831. 2010.

SCHWANDER, F.; EIBACH, R.; FECHTER, I.; HAUSMANN, L.; ZYPRIAN, E.; TÖPFER, R. Rpv10: a new locus from the Asian *Vitis* gene pool for pyramiding downy mildew resistance loci in grapevine. **Theoretical and Applied Genetics** 124:163–176. 2012.

SEFC, K.M.; LOPES, M.S.; LEFORT, F.; BOTTA, R.; ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K.A.; IBÁÑEZ, J.; PEJIC, I.; WAGNER, H.W.; GLÖSSL, J.; STEINKELLNER, H. Microsatellite variability in grapevine cultivars from different European regions and evaluation of assignment testing to assess the geographic origin of cultivars. **Theoretical and Applied Genetics** 100:498–505. 2000.

SHI, A.; CHEN, P.; LI, D.; ZHENG, C.; ZHANG, B.; HOU, A. Pyramiding multiple genes for resistance to soybean mosaic virus in soybean using molecular markers. **Molecular Breeding** 23: 113–124. 2009.

SHIMANO I.S.H.; SENTELHAS, P.C. Risco climático para ocorrência de doenças fúngicas da videira no Sul e Sudeste do Brasil. **Revista Ciência Agronômica** 44(3): 527-537. 2013.

SINGH, S.; SIDHU, J.S.; HUANG, N.; VIKAL, Y.; LI, Z.; BRAR, D.S.; DHALIWAL, H.S.; KHUSH, G.S. Pyramiding three bacterial blight resistance genes (xa5, xa13 and Xa21) using marker-assisted selection into indica rice cultivar PR106. **Theoretical and Applied Genetics** 102:1011–1015. 2001.

SOUSA, J.S.I. **Uvas para o Brasil**. Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz – FEALQ, 1996. 791p.

STAUDT, G. Evaluation of resistance to grapevine powdery mildew (*Uncinula necator* [Scxw.] BURR. anamorph *Oidium tuckeri* BERK.) in accessions of *Vitis* species. **Vitis** 36 (3): 1S1-1S4. 1997.

TAPIERO, A.L.; ARISTIZÁBAL, D.; LEVY, M. Exclusión de linajes como estrategia para la obtención de resistencia durable en el arroz a *Pyricularia grisea* Sacc. en Colombia. **Revista Corpoica** 4(1): 15-28. 2003.

TAR'NA, B.; BUCHWALDT, L.; TULLU, A.; BANNIZA, S.; WARKENTIN, T.D.; VANDENBERG, A. Using molecular markers to pyramid genes for resistance to ascochyta blight and anthracnose in lentil (*Lens culinaris* Medik). **Euphytica** 134: 223–230. 2003.

TERRAL, J.F.; TABARD, E.; BOUBY, L.; IVORRA, S.; PASTOR, T.; FIGUEIRAL, I.; PICQ, S.; CHEVANCE, J.B.; JUNG, C.; FABRE, L.; TARDY, C.; COMPAN, M.; BACILIERI, R.; LACOMBE, T.; THIS, P. Evolution and history of grapevine (*Vitis vinifera*) under domestication: new morphometric perspectives to understand seed domestication syndrome and reveal origins of ancient European cultivars. **Annals of Botany** 105: 443–455. 2010.

TEIXEIRA, A.H.C.; SOUZA, R.A.; RIBEIRO, P.H.B.; REIS, V.C.S.; SANTOS M.G.L. Aptidão agroclimática da cultura da videira no Estado da Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental** 6(1): 107-111. 2002.

THIS, P.; JUNG, A.; BOCCACCI, P.; BORREGO, J.; BOTTA, R.; COSTANTINI, L.; CRESPIAN, M.; DANGL, G.S.; EISENHELD, C.; FERREIRA-MONTEIRO, F.; GRANDO, S.; IBÁÑEZ, J.; LACOMBE, T.; LAUCOU, V.; MAGALHÃES, R.; MEREDITH, C.P.; MILANI, N.; PETERLUNGER, E.; REGNER, F.; ZULINI, L.; MAUL, E. Development of a standard set of microsatellite reference alleles for identification of grape cultivars. **Theoretical and Applied Genetics** 109: 1448–1458. 2004.

THIS, P.; LACOMBE, T.; THOMAS, M.R. Historical origins and genetic diversity of wine grapes. **TRENDS in Genetics** 22(9): 511-519. 2006.

TROGGIO, M.; MALACARNE, G.; COPPOLA, G.; SEGALA, C.; CARTWRIGHT, D.A.; PINDO, M.; STEFANINI, M.; MANK, R.; MOROLDO, M.; MORGANTE, M.; GRANDO, M.S.; VELASCO, R. A Dense Single-Nucleotide Polymorphism-Based Genetic Linkage Map of Grapevine (*Vitis vinifera* L.) Anchoring Pinot Noir Bacterial Artificial Chromosome Contigs. **Genetics** 176: 2637–2650. 2007.

TWARDOWSKA, M.; MASOJC, P.; MILCZARSKI, P. Pyramiding genes affecting sprouting resistance in Rye by means of marker assisted selection. **Euphytica** 143: 257–260. 2005.

VENUTI, S.; COPETTI, D.; FORIA, S.; FALGINELLA, L.; HOFFMANN, S.; BELLIN, D.; CINDRIC, P.; KOZMA, P.; SCALABRIN, S.; MORGANTE, M.; TESTOLIN, R.; DI GASPERO G. Historical introgression of the downy mildew resistance gene Rpv12 from the asian species *Vitis amurensis* into grapevine varieties. **PLoS ONE** 8(4): e61228. doi:10.1371/journal.pone.0061228. 2013.

VIGNANI, R.; BOWERS, J.E.; MEREDITH, C.P. Microsatellite DNA polymorphism analysis of clones of *Vitis vinifera* ‘Sangiovese’. **Scientia Horticulturae** 65:163- 169. 1996.

WELTER, L.J.; GÖKTÜRK-BAYDAR, N.; AKKURT, M.; MAUL, E.; EIBACH, R.; TÖPFER, R.; ZYPRIAN, E.M. Genetic mapping and localization of quantitative trait loci affecting fungal disease resistance and leaf morphology in grapevine (*Vitis vinifera* L). **Molecular Breeding** 20:359–374. 2007.

WIEDEMANN-MERDINOGLU, S.; PRADO, E.; COSTE, P.; DUMAS, V.; BUTTERLIN, G.; BOUQUET, A.; MERDINOGLU, D. **Genetic Analysis of Resistance to Downy Mildew from *Muscadinia rotundifolia***. 9th Int.Conf. Grape Genet. Breed. Udine, Italy. 2006.

WINKLER, A.J. **Vitivinicultura**. Continental S.A. 1ed espanhol, 1980. 792 p.

WU, L.; WANG, C. Application of molecular marker assisted selection in gene pyramiding and selection of new cultivars. **Journal of Northeast Agricultural University** 18(1): 79-84. 2011.

XU, Y.; ZHU, L.; XIAO, J.; HUANG, N.; McCOUCH, S.R. Chromosomal regions associated with segregation distortion of molecular markers in F2, backcross, doubled haploid, and recombinant inbred populations in rice (*Oryza sativa* L.). **Molecular Genetics and Genomics** 253: 535 -545. 1997.

YANG, L.; WANG, W.; YANG, W.; WANG, M. Marker-assisted selection for pyramiding the *waxy* and *opaque-16* genes in maize using cross and backcross schemes. **Molecular Breeding** 31:767–775. 2013.

ZAMIR, D.; TADMOR, Y. Unequal segregation of nuclear genes in plants. **Botanical Gazette** 147 (3): 355–358. 1986.

ZHANG, W.L.; YANG, W.P.; CHEN, Z.W.; WANG, M.C.; YANG, L.Q.; CAI, Y.L. Molecular Marker-Assisted Selection for *o2* Introgression Lines with *o16* Gene in Corn. **Acta Agronomica Sinica** 36:1302–1309. 2010.